



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Actividad antioxidante in vitro y fotoprotectora in vivo
del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa
orellana* L. “achiote” y elaboración de una forma
dermocosmética**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Carlos Augusto YARIN CARRIZALES

ASESORES

Paul Iván GUTIÉRREZ ELESCANO

Carlos BRAVO CATAMAYO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Yarin C. Actividad antioxidante in vitro y fotoprotectora in vivo del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote” y elaboración de una forma dermocosmética [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Actividad antioxidante in vitro y fotoprotectora in vivo del extracto hidroalcohólico de semillas de Bixa orellana L. "achiote" y elaboración de una forma dermocosmética
Área de investigación	Productos farmacéuticos, productos sanitarios, dispositivos médicos y cosméticos.
Líneas de Investigación	Cosméticos
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación	Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Intitulación que financia si corresponde	No corresponde
Año o rango de años que abarcó	2016 – 2018
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Yarin Carrizales, Carlos Augusto
Numero de matrícula	09040081
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	---
DATOS DEL ASESOR	
Apellidos y nombre	Gutiérrez Elescano, Paul Iván
Código docente	0A1909
Máximo grado alcanzado	Bachiller Farmacia y Bioquímica
Código ORCID (obligatorio)	orcid.org/0000-0003-3426-5915
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Departamento Académico de Farmacotecnia y Administración Farmacéutica
Instituto de Investigación al que pertenece	No aplica
Grupo de investigación al que pertenece, indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	No aplica



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Actividad antioxidante *in vitro* y fotoprotectora *in vivo* del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. "achiote" y elaboración de una forma dermocosmética"

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

CARLOS AUGUSTO YARIN CARRIZALES

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Diecisiete (17) Sobresaliente

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 19 de diciembre de 2019


Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte
Presidente


Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Miembro


Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar
Miembro


Q.F. José Fidel Jáuregui Maldonado
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



DEDICATORIA

A Dios, por protegerme y darme las fuerzas necesarias para terminar cada objetivo trazado en mi vida.

A mis padres y hermanos, por darme todo su amor y cariño. Ustedes representan la mayor motivación para la realización de cada meta propuesta en mi vida, los quiero.

A mi querida abuelita Augusta Camac, que gracias a su guía y bendición he logrado los objetivos que me he propuesto.

A mi enamorada, porque llena mi vida de amor y felicidad a cada segundo.

A mis maestros, por sus enseñanzas brindadas y hacer de mi un hombre de bien en lo profesional y personal.

A cada uno de mis amigos, que en el camino de la vida pude conocer. Gracias a ustedes, son una valiosa enseñanza.

AGRADECIMIENTO

Al honorable jurado examinador y calificador:

Dra. Luisa Negrón Ballarte

Dra. Carmen Peña Suasnabar

Dr. José Jáuregui Maldonado

Dr. Luis Miguel Félix Veliz

Por sus invaluable consejos y observaciones que terminaron de dar forma a esta corta obra, por su dedicación a la enseñanza universitaria, por su energía para nuevos retos y promoción de la investigación.

A mis asesores:

Q.F. Paul Gutiérrez Elescano

Q.F. Carlos Bravo Catamayo

Por su apoyo y confianza, acertado asesoramiento y constante apoyo para el desarrollo y culminación del presente trabajo.

A todos los profesores abnegados y sacrificados de nuestra facultad porque cuando imparten sus conocimientos y enseñanzas contribuyen al desarrollo de nuestra maravillosa profesión y del país.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Objetivo general	3
1.2.	Objetivos específicos	3
II.	GENERALIDADES.....	4
2.1.	Aspectos botánicos.....	5
2.2.	Aspectos químicos	7
2.3.	Actividad biológica	9
2.4.	Fotoprotectores.....	13
2.5.	Cosméticos	21
2.5.1.	Formas cosméticas	22
2.5.2.	Perfil del Producto.....	23
2.5.3.	Preformulación.....	23
2.5.4.	Desarrollo de formulación.....	24
III.	PARTE EXPERIMENTAL	25
3.1.	Materiales y métodos	25
3.2.	Material Biológico	26
3.3.	Entidades donde se desarrolló la investigación.....	26
3.4.	Tipo de investigación	26
3.5.	Flujograma del proceso de investigación	27
3.6.	Extracción de los activos.....	27

3.7.	Identificación de grupos fitoquímicos.....	29
3.8.	Determinación de la actividad antioxidante	30
3.9.	Desarrollo de la forma cosmética y su elaboración	31
3.10.	Evaluación de la acción fotoprotectora	39
3.11.	Análisis estadístico.....	41
IV.	RESULTADOS.....	43
4.1.	Estudio Farmacognóstico	43
4.1.1.	Análisis Organoléptico.....	43
4.1.2.	Marcha Fitoquímica	43
4.2.	Características organolépticas y fisicoquímicas de la preformulación	44
4.3.	Determinación de actividad antioxidante.....	45
4.4.	Resultado del estudio de fotoprotección	47
V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	53
VII.	RECOMENDACIONES	54
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	55
IX.	ANEXOS.....	63

RESUMEN

El achiote es un arbusto originario de la selva tropical sudamericana y es muy utilizado por la población por sus diversas propiedades benéficas. El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antioxidante *in vitro* y el efecto fotoprotector *in vivo* de una crema dermocosmética elaborada con extracto hidroalcohólico de las semillas de *Bixa orellana* L. “achiote”. Este estudio fue de tipo experimental y prospectivo. Se preparó el extracto hidroalcohólico a partir de las semillas frescas de achiote. La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico se evaluó *in vitro* mediante la metodología del DPPH. Para evaluar la actividad de fotoprotección *in vivo* se trabajó con 35 ratas de la especie *Rattus rattus* de 8 semanas de edad con peso promedio 200 ± 20 g de la cepa Holtzman, distribuidos en siete grupos de cinco unidades cada uno. Se elaboraron cremas dermocosméticas a concentraciones del 1%, 3% y 8% del extracto hidroalcohólico, que fueron aplicadas en el lomo de los animales para posteriormente ser irradiados con luz ultravioleta B (UVB). En los resultados se obtuvo por el método de neutralización de los radicales 1,1- difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) una concentración inhibitoria media (IC50) de $5,621 \times 10^3$ ug/mL del extracto hidroalcohólico de las semillas. Con respecto a la capacidad de fotoprotección se obtuvo que en el análisis macroscópico e histológico de la piel expuesta a radiación ultravioleta B (UVB), diferencias significativas favorables a las cremas con extracto frente a un bloqueador comercial. Los resultados muestran que el extracto de achiote no posee un potencial antioxidante significativo. Así mismo la crema con extracto de achiote presentó un efecto fotoprotector sobre la piel inducida frente a las radiaciones ultravioleta B (UVB).

Palabras clave: *Bixa orellana* L., actividad antioxidante, actividad fotoprotectora, DPPH.

SUMMARY

The achiote is a shrub native to the South American rainforest and is widely used by the population for its various beneficial properties. The objective of the investigation was to determine the antioxidant activity in vitro and the photoprotective effect in vivo of a dermocosmetic cream made with hydroalcoholic extract of the seeds of *Bixa orellana* L. "achiote". This study was experimental and prospective. The hydroalcoholic extract was prepared from the fresh achiote seeds. The antioxidant activity of the hydroalcoholic extract was evaluated in vitro using the DPPH methodology. To evaluate the photoprotection activity in vivo, we worked with 35 rats of the *Rattus rattus* species of 8 weeks of age with an average weight of 200 ± 20 g of the Holtzman strain, distributed in seven groups of five units each. Dermocosmetic creams were made at concentrations of 1%, 3% and 8% of the hydroalcoholic extract, which were applied to the animals' backs and later irradiated with ultraviolet B (UVB) light. In the results, a mean inhibitory concentration (IC₅₀) of $5,621 \times 10^3$ ug / mL of the hydroalcoholic extract of the seeds was obtained by the method of neutralization of 1,1-diphenyl-2-picril-hydrazyl (DPPH) radicals. With respect to the photoprotection capacity it was obtained that in the macroscopic and histological analysis of the skin exposed to ultraviolet B (UVB) radiation, significant differences favorable to the creams with extract compared to a commercial blocker. The results show that achiote extract does not have a significant antioxidant potential. Likewise, the cream with achiote extract presented a photoprotective effect on the skin induced against ultraviolet B (UVB) radiation.

Key words: *Bixa orellana* L., antioxidant activity, photoprotective activity, DPPH.

I. INTRODUCCIÓN

Existen plantas con propiedades medicinales en la amazonia que no son muy conocidas, de los cuales podrían aprovecharse su alto potencial medicinal mediante estudios tecnificados de sus extractos naturales y lograr evidenciar las propiedades de los principios activos, entre ellas su actividad antioxidante y actividad fotoprotectora ⁽¹⁾.

Otro de los insumos que están siendo cuestionados son los colorantes de origen no natural. Estos colorantes han generado cierta resistencia en su uso por parte de los consumidores.

Como consecuencia estos tipos de colorantes sintéticos vienen siendo reemplazados por uno de origen natural, como es el caso del achiote. Estos últimos colorantes no generan ningún perjuicio a nuestro organismo al usarlo en dosis y condiciones apropiadas en formulaciones ⁽²⁾.

La humanidad ha utilizado a las plantas con fines de alimentación o terapéuticos desde sus orígenes, esto se ha evidenciado en cada parte del mundo donde había alguna población. Según la OMS el uso de las plantas con fines medicinales se ha incrementado en estos últimos años. Así mismo la FAO indica que más de la mitad de la población usa dichas plantas con fines terapéuticos ⁽³⁾.

Actualmente se están estudiando las plantas, buscando nuevos principios activos que dispongan de propiedades beneficiosas para su uso ^(4, 5). En la selva sudamericana se encuentra gran variedad de especies vegetales y en el presente trabajo se estudió la *Bixa orellana* L., la cual, dentro de sus múltiples propiedades medicinales, por ejemplo, se ha hecho uso de las hojas como antiinflamatorio y en otros como antimicrobiano ^(6, 7, 8). Por otro lado, la OMS considera que se debe hacer uso de las plantas con fines medicinales y terapéuticos siempre en cuando estas tengan un sustento científico ⁽⁹⁾.

La especie *Bixa orellana* L. “achiote” ha despertado gran interés en diversos sectores industriales como el cosmético y alimenticio entre otros, esto ha generado un aumento de su demanda como colorante natural ⁽¹⁰⁾.

La parte vegetal de interés en este estudio son las semillas, dentro de la cual se encuentra la bixina y norbixina tal como indica Meñaca *et al* (2010). Este compuesto está impregnado en toda la superficie de la semilla y es el mayor componente del mismo. Además de este compuesto, se encuentran otros en menor proporción como aceites, resina y otros colorantes ⁽¹¹⁾.

En publicaciones de la OMS, la bixina se considera un colorante que puede ser utilizado en diversos productos por su alto grado de inocuidad, lo cual se da por su nula toxicidad. En la industria cosmética se puede utilizar en productos que se aplican a la piel y en la industria alimentaria en productos para el consumo ⁽¹²⁾.

Existe mucho rechazo al uso de antioxidante sintéticos, como butilhidroxitolueno entre otros, ya que se ha relacionado el uso de estos compuestos con la carcinogenicidad y toxicidad ^(13, 14). Debido a estos cuestionamientos, para utilizar un nuevo compuesto antioxidante de origen natural, se deben realizar diversos estudios que garanticen un uso adecuado. Estos antioxidantes al tener un origen vegetal pueden cumplir en mayor grado funciones como las que están en nuestros organismos sin tener repercusiones negativas como las de origen sintético ⁽¹⁵⁾.

El objetivo de la investigación fue conocer la presencia de actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las semillas de achiote y evaluar la capacidad fotoprotectora de una forma dermocosmética a base del extracto. Estas propiedades se basan en recopilaciones etnobotánicas, lo cual se pudo evaluar en diversos estudios desde su extracción hasta la elaboración de una forma dermocosmética.

1.1. Objetivo general

1. Determinar la actividad antioxidante *in vitro* y la actividad fotoprotectora *in vivo* del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote” y elaborar una forma dermocosmética.

1.2. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote”.
2. Elaborar una forma dermocosmética con el extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote”.
3. Determinar la actividad fotoprotectora *in vivo* de la formula dermocosmética a base del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote”.

II. GENERALIDADES

En la actualidad la industria cosmética tiene un alto interés por el uso de los recursos naturales en sus productos. Esto por sus diversos beneficios, su inocuidad y la tendencia a nivel internacional hacia el uso de lo natural.

Existen estudios que se han generado para prevenir el eritema cutáneo, por la exposición a los rayos solares y principalmente a la radiación UV. Es aquí donde entra a tallar los insumos con propiedades antioxidantes y fotoprotectora, los cuales pueden servir para prevenir el riesgo a la exposición, sin embargo, también se debe evaluar si combate los daños a nivel molecular que se producen por acción de las radiaciones ⁽¹⁶⁾.

Cabe precisar que la actual normativa que nos rige a nivel internacional, la Decisión 833 de la Comunidad Andina, que es una actualización de la decisión 516, hace hincapié en el control de calidad y vigilancia sanitaria; en este contexto la investigación de nuevos insumos para la industria cosmética se debe complementar los estudios con ensayos de toxicidad crónica y aguda en los productos cosméticos ⁽¹⁷⁾.

Existe una gran oportunidad en el estudio de plantas con propiedades medicinales, especialmente con capacidad fotoprotectora que se pueden aprovechar para la elaboración de insumos en formulaciones cosméticas.

En el presente estudio, se eligió la *Bixa orellana* L. “achiote” por presentar propiedades antioxidante y fotoprotectora, esto se basa en las referencias etnobotánicas y bibliográficas que se ha encontrado sobre esta especie vegetal. Adicionalmente se plantea realizar una preformulación de una base dermocosmética como protector solar.

2.1. Aspectos botánicos

2.1.1. Taxonomía botánica

La clasificación taxonómica de la planta según el Sistema de Clasificación Cronquist (1998) es el siguiente:

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Orden : Malvales

Familia : Bixaceae

Género : Bixa

Especie : Bixa orellana L.

Nombre vulgar : Achiote



Figura 1: Fruto de la *Bixa orellana* L. “achiote”

Fuente: REVISTA Universidad EAFIT; *Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote* ⁽²⁾.

2.1.2. Descripción botánica

La especie *Bixa orellana* L. es una planta tropical nativa de América de la familia de las Bixaceae, que puede llegar a ser un arbusto o un árbol pequeño, llega a medir entre 1 a 5 metros de altura, tiene una copa baja y extendida, además posee un tallo pardo y ramificado a poca altura del terreno⁽¹⁸⁾.

Las hojas son simples y grandes con márgenes lisos, de coloración verdosas claras.

Las flores se disponen en ramilletes, las cuales tienen una coloración blanquecina a rosadas según las variedades.

El fruto es una cápsula roja de 2 a 6 cm de largo, la cual tiene pelos gruesos espinosos. En su juventud tiene un color verde, pero conforme van madurando adquiere un color rosado, rojo, rojo oscuro o marrón. En cada cápsula hay semillas en número variable de 10 a 50, en relación con el tamaño capsular.

La semilla es comprimida, de 5 mm de largo, con tegumento recubierto de una sustancia viscosa de color rojizo intenso⁽¹⁸⁾. Son pequeñas, livianas y su forma varía desde la pirámide - triangular hasta la redondeada⁽¹⁹⁾.

La planta crece usualmente en climas tropicales, sin embargo, tiene gran adaptación en diferentes condiciones climáticas, pudiendo desarrollar desde el nivel del mar hasta alturas superiores a los 1250 m.s.n.m.

La planta ha llegado a adaptarse a diferentes tipos de suelos, siendo ideales los suelos aluviales, con buen drenaje y con alto porcentaje de materia orgánica, los suelos con pH ligeramente ácidos son apropiados para una buena fertilidad.

El beneficio comercial es la práctica de obtención de la semilla, realizándose dos veces al año en la cosecha, la extracción del grano, secado, ensacado y almacenaje⁽²⁰⁾.

Se utiliza su pigmento natural, el cual tiene importancia como aditivo en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Su aceptabilidad continúa en expansión ya que el Annato es reconocido como un colorante de alimentos vegetal seguro⁽²¹⁾.

Entre los productores de esta planta se encuentra Perú, Venezuela, Brasil, Ecuador entre otros⁽²²⁾.

2.1.3. Historia

El achiote se ha desarrollado en el área tropical desde centro América hasta Sudamérica, la cual se tiene referencia de su existencia desde épocas antiguas ⁽²³⁾.

Se tiene conocimiento del uso de las semillas en algunas poblaciones, las cuales lo utilizaban para pintar su cuerpo con fines cosméticos y evitar a los mosquitos, este uso se vio en la selva sudamericana. Existen otros usos como los culinarios para dar una coloración característica, la tinción de tejidos u otros enseres del hogar ^(19, 24).

A fines del siglo XVI y comienzos del siglo XVII según Bernal H. y Correa J. ⁽¹⁹⁾ hubo mucho intercambio cultural entre España y Perú, y dentro de ello se vio que se llevaron semillas de achiote para su uso culinario. Además, el origen del nombre de esta planta se dio según cuentan los historiadores por vocablos indígenas y algunos por términos españoles o como estos lo pronunciaban. El término achiote tiene su origen en la palabra “Achiotl” la cual se ha mantenido hasta nuestros días. Se tiene como información histórica, que algunas poblaciones del Caribe, llamaban a la planta en cuestión “onoto”, el cual luego derivó posteriormente al nombre “annato” ⁽¹⁹⁾.

La clasificación que Linneo realizó, se basó en dos referencias históricas. El primer término “Bixa” se dio por origen indígena que fue lo que reportaron los españoles a su llegada a América. El segundo término “orellana” se dio en honor a uno de los primeros españoles que fue al Amazonas, esto fue en los viajes de Pizarro y sus conquistas ⁽²⁴⁾.

2.2. Aspectos químicos

2.2.1. Composición química

La *Bixa orellana* L. tiene dentro de sus componentes principales a los carotenoides, dentro de ellas destacan la bixina y la norbixina. También se hayan compuestos terpenoides, flavonoides y tocotrienoles. En otros estudios se describen que dentro de las semillas se encuentra compuestos lipídicos como es el ácido linoleico y oleico; así también minerales como hierro, fosforo, calcio y zinc ^(25,26,27).

Están presentes en la semilla dos pigmentos, el principal es la bixina la cual tiene una tonalidad roja con anaranjado. El segundo es la norbixina que su coloración es más amarilla.

A continuación, se describe la composición química nutricional del achiote.

Tabla N° 1. Composición química de la semilla del achiote

Composición química (%)	
Humedad	8,00 – 13,00
Proteína	13-14,24
Celulosa	13,8
Fibra Cruda	18,48
Almidones	11,45
Carbohidratos totales	39,91
Ceniza	4,50 – 7,97
Energía	54 kcal

Tabla N° 2. Composición nutricional de la semilla del achiote

Composición (mg / 100g)	
Calcio	7
Fósforo	10
Hierro	1,4
Vitamina A	45
Riboflavina	0,2
Niacina	1,46
Tiamina	0,39
Ácido ascórbico	12,5

Fuente: REVISTA Universidad EAFIT; Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote ⁽²⁾.

2.2.2. El colorante.

El componente en mayor proporción es el pigmento bixina, este tiene un color rojo oscuro. Su composición química compacta es $C_{25}H_{30}O_4$, que es estructuralmente un derivado de ácido carotenoide. El 80% de los compuestos que están presente en la semilla de achiote es la bixina, le sigue en proporción la norbixina y otros compuestos. En estos últimos encontramos saponinas, taninos y fitoesteres. En las hojas se pueden encontrar compuestos como los flavonoides, luteolinas y apigeninas entre otros de menor proporción ⁽²⁸⁾.

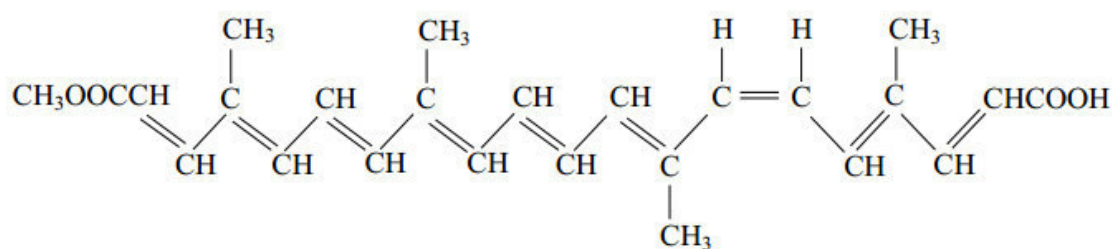


Figura N° 2. Ácido cis-polieno monometilester dicarboxílico (bixina)

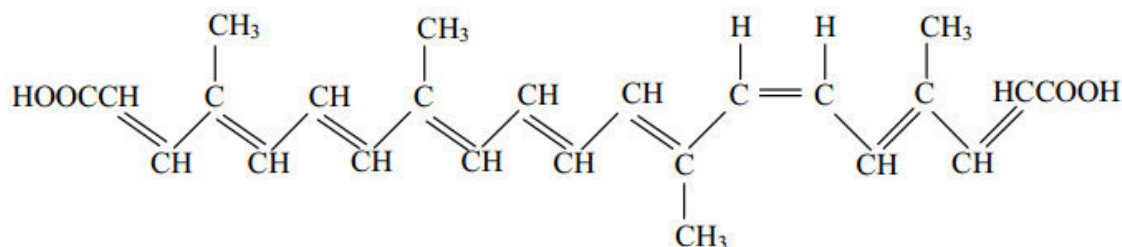


Figura N° 3. Estructura de la norbixina

Fuente: REVISTA Universidad EAFIT; Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote ⁽²⁾.

2.3. Actividad biológica

2.3.1. Actividad antioxidante

Existen varios estudios sobre la importancia de los compuestos antioxidantes presentes en frutas o vegetales. Es muy conocida las propiedades beneficiosas que estas generan en nuestro organismo al consumirlas habitualmente y en proporciones correctas. Uno de los más resaltantes es la vitamina C. Dentro de

los beneficios de los antioxidantes esta que contrarresta los efectos nocivos del estrés oxidativo, el cual es fuente de varios problemas a nivel celular ^(29, 30).

2.3.2. Los radicales libres y la oxidación

Los radicales libres son responsables de los efectos negativos para nuestro organismo, esto se da a nivel celular, ya que altera la estructura química de diversos compuestos como el ADN, proteínas o grasas. Esto implica que, si hay alguna modificación a nivel del ADN, se podría afectar la división celular y por consecuente puede ocasionar problemas en sus funciones propias o incluso aumentar el riesgo de proliferación de células cancerosas.

Entre otros daños que produce los radicales libre y la oxidación, es sobre el ADN mitocondrial que al verse afectado puede generar procesos carcinogénicos. A nivel de las proteínas estas se ven afectadas por la oxidación que va a desnaturalizar su estructura. Con respecto a los lípidos, estos se ven afectados en la membrana celular por cambios en la permeabilidad, lo cual llevará a la muerte de la célula ⁽³¹⁾.

2.3.3. Estrés oxidativo y defensa antioxidante

Existen muchas evidencias de que la oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos, inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, se relaciona con un aumento en la incidencia de las principales enfermedades degenerativas de los seres humanos. En este proceso se generar radicales libres de oxígenos, dentro de los cuales podemos encontrar radicales superóxidos, también el peróxido de hidrógeno que es muy dañino, y otros como el oxígeno singlete ⁽³²⁾.

Nuestro organismo ha desarrollado defensas contra el estrés oxidativo y los radicales libres que se liberan. Dentro de ellas están los compuestos antioxidantes como es el superóxido dismutasa el cual reacciona con los radicales libre y lo inactiva. Además, está el glutatión peroxidasa y catalasa los cuales reaccionan con los compuestos radicales y convierten en agua. Existen

otros compuestos como son las vitaminas E y C que ayudan por sus propiedades antioxidantes ⁽³³⁾.

Existen otras formas de combatir el estrés oxidativo, que mucho daño nos genera, y son mediante el consumo de verduras y frutas, que tienen compuestos antioxidantes y también ayudan a incrementar nuestras defensas. Estos compuestos están presentes en las hojas, flores o frutos dependiendo de cada planta.

2.3.4. Compuestos polifenólicos como antioxidantes

Dentro de los metabolitos secundarios encontramos los compuestos polifenólicos. Los cuales son biosintetizados en las plantas. Algunos metabolitos son los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, fenilpropenos. Estos compuestos actúan capturando y estabilizando los compuestos oxidantes, en algunos casos producen quelación dentro de su estructura de metales. En otros casos su acción se debe a la inactivación de ciertas enzimas como la lipooxigenasa.

Los polifenoles actúan principalmente capturando los radicales libres, estos a su vez ya no producen una reacción en cascada y se frena el potencial efecto desestabilizador de la oxidación. Luego de que la sustancia antioxidante captura al radical libre, este se transforma en un radical activo que tiene la característica que puede ser estabilizado por la función antioxidante del organismo ⁽³⁴⁾.

2.3.5. Modelos *in vitro*

El método de medición *in vitro* se realiza por la disminución o inhibición de formación de radicales libres, los cuales son capturados. Esto se da por el efecto que tiene los activos antioxidantes que posee nuestro extracto en evaluación, el cual se da al añadir un catalizador de la reacción ^(35, 36).

Dentro de las metodologías más utilizadas se encuentran los que realizan el secuestro de radicales libre, estos son la prueba de DPPH y ABTS. Las pruebas en mención son modernas y se caracterizan por su medición de la diferencia

entre la longitud de las muestras antes y después de la acción del reactivo patrón con propiedades antioxidantes. La prueba se realiza con el equipo de espectrofotómetro UV-VIS (ultravioleta visible) ⁽³⁷⁾.

a) Prueba con DPPH

En este método se tiene el reactivo DPPH (1,1 difenil – 2 – picrilhidrazilo), el cual es un compuesto radical que tiene un color violeta, luego este absorbe la radiación a una longitud de onda de 517 nm. La prueba comienza cuando se determina la concentración de inicio del reactivo de DPPH, luego se añade la solución antioxidante y finalmente se mide la concentración final; de este modo se tiene la disminución de radicales libre por acción de la solución antioxidante y el potencial del mismo ⁽³⁸⁾.

b) Prueba ABTS

Este método se realiza con el reactivo ABTS (azinobis 3 – etilbenzotiazolina – 6 ácido sulfónico), el cual en al reaccionar con un reactivo oxidante forma un radical catión del ABTS y este es coloreado. Una de las ventajas de usar este método es que tiene un amplio rango de pH, además el ABTS es soluble en medio orgánico y acuoso, esto nos da que pueda evaluarse antioxidante de naturaleza hidrofílicos y lipofílicos. El radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato 23 potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (± 25 °C) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μ L de la muestra. A 980 μ L de dilución del radical ABTS^{•+} así generado se le determina la absorbancia a 30 °C, se añade 20 μ L de la muestra (dilución de antocianos) y luego de 1 minuto se mide de nuevo la absorbancia a 754 nm. Se mide la absorbancia de forma continua hasta 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, TROLOX (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%) se ensaya a una concentración de 0-15 μ M (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en

actividad antioxidante equivalente a Trolox y en actividad antioxidante equivalente a vitamina C ⁽³⁹⁾.

2.4. Fotoprotectores

Este tipo de compuestos se suelen aplicar vía tópica directamente en la piel que se requiere proteger, ya que parte de su mecanismo de acción es reflejar la radiación ultravioleta (UV). Adicionalmente, deberían proporcionarnos otros beneficios como prevención del fotoenvejecimiento cutáneo, fotodermatitis y en especial la prevención del cáncer cutáneo ⁽⁴⁰⁾.

Desde un punto de vista fotobiológico, los fotoprotectores deben:

- 1) Disminuir la generación de compuestos pirimidina
- 2) Prevenir la mutación en el gen supresor tumoral p53.
- 3) Brindar protección frente a la inmunosupresión local y sistémica fotoinducida por el sol.
- 4) Disminuir la formación de queratinocitos apoptóticos (sunburn cells).

2.4.1. Los fotoprotectores sistémicos

Estos compuestos actúan protegiendo la piel por su naturaleza química y sus propiedades antioxidantes. Algunos de estos fotoprotectores han sido evaluados para ser usados en productos de fotoprotección.

Uno de ellos son los betacarotenos que ayudan a aminorar la fotosensibilidad.

Los principales agentes fotoprotectores se observan en la siguiente tabla ⁽⁴¹⁾.

Tabla N° 3: Principales agentes fotoprotectores

TÓPICOS	Filtros orgánicos	
	Filtros inorgánicos	
	Antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vitamina C y vitamina E ✓ Carotenoides: <ul style="list-style-type: none"> Betacaroteno Astaxantina Luteína ✓ Polifenoles: <ul style="list-style-type: none"> Flavonoides: Genisteína, Silimarina, Isoflavonas del trébol rojo (equol), Apigenina Ácidos hidroxicinámicos: Ácido ferúlico, Ácido cafeico Extracto de <i>Polypodium leucotomus</i>
SISTÉMICOS	Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Licopeno ✓ Luteína y zeaxantina
	Plantas de la dieta	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Extracto de <i>Polypodium leucotomus</i> ✓ Té verde ✓ Genisteína
	Ácidos grasos poliinsaturados omega-3	
	Combinación de antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vitamina E y vitamina C ✓ Licopeno, betacaroteno, α-tocoferol y selenio ✓ Seresis: carotenoides, vitamina C y E, selenio y proantocianidinas

Fuente: Fotoprotección, Yolanda Gilaberte. Sección I Fotobiología. Fotodermatología. 2010 ⁽⁴⁶⁾.

2.4.2. Fotoprotectores tópicos

Estos tipos de fotoprotectores contienen entre dos o seis filtros solares que tienen sus propiedades a los siguientes mecanismos:

- a) Bloquea la penetración en el estrato corneo de la radiación UV mediante la filtración y absorción.
- b) Actúa dispersando las radiaciones que recibe nuestra piel
- c) Reflexión de las radiaciones mediante la aplicación de sustancias “barrera”
- d) Inactivación o eliminación de los radicales libres y las ERO que se producen en la piel fotoexpuesta
- e) Proporciona una reparación del daño cutáneo originado por la radiación solar ⁽⁴⁰⁾.

2.4.3. Fotoprotectores químicos u orgánicos

Estos fotoprotectores tienen la propiedad de absorber energía emitida por las radiaciones UV. Luego de absorber esta energía, las moléculas pasan a un estado excitado lo cual posteriormente libera energía en forma de calor. Esta energía es liberada por transferencia a otras moléculas u fluorescencia. Puede darse el caso que la energía no pueda ser liberada, en ese caso la molécula fotoprotectora podría romperse o cambiar su estructura mediante un ciclo adición, foto adición u fotofragmentación ⁽⁴²⁾.

a) Fotoprotectores Ultravioleta A (UVA):

Dentro de estos compuestos tenemos a las benzofenonas, avobenzona entre otros. Cabe resaltar que estos fotoprotectores también absorben en menor medida radiación del tipo ultravioleta B (UVB). En este grupo es muy utilizado la oxibenzona la cual absorbe los dos tipos de radiación ultravioleta A (UVA) y ultravioleta B (UVB). También se tiene a la avobenzona la cual tiene la característica que no es fotoestable ⁽⁴¹⁾.

b) Fotoprotectores Ultravioleta B (UVB):

Dentro de este grupo de fotoprotectores encontramos a los cinamatos, salicilatos y también al octocrileno. Estos compuestos actúan bloqueando las radiaciones ultravioleta B (UVB) y nos dan una protección evitando eritemas

y quemaduras. Uno de los primeros compuestos en utilizarse fue el ácido paraaminobenzoico, sin embargo, su uso se vio disminuido por mostrar reacciones alérgicas.

Actualmente el grupo más utilizado son los cinamatos dentro de las formulaciones con propiedades fotoprotectoras frente a las radiaciones ultravioleta B (UVB). Otro grupo usado son los salicilatos que, aunque no absorben mucha radiación, su seguridad es mucho mejor. Así mismo estos últimos ayudan a la avobenzona a solubilizar. Por último, tenemos al octocrileno el cual es fotoestable y ayuda a la resistencia frente al agua ^(41, 43).

c) Fotoprotectores Ultravioleta A y B (UVA y UVB):

Existen filtros que poseen la capacidad de protegernos frente a los dos tipos de radiaciones mencionadas. Dentro de ellas tenemos al drometrizol trisiloxano, ácido tereftalideno-dialcanfor sulfónico, este último potencia el efecto fotoprotector. Uno de los filtros actuales es el dibenzotriazol el cual presenta un espectro más amplio de absorción y es fotoestable. Tiene además un gran peso molecular, lo cual impide que entre en nuestra piel, y por ello su mecanismo de acción es mediante una reflexión o transferencia de energía ^(44, 45).

Tabla N° 4: Principales filtros fotoprotectores

Sustancia	Concentración	Pico de absorción
Filtros químicos principalmente Ultravioleta B		
PABA Y DERIVADOS		
Ácido 4-aminobenzoico	5 %	283-289 nm
Padimato O	1,4-8 %	290 nm
Padimato A	1-5 %	
Etil 4[bis(hidroxiprolil)] aminobenzoato*	1-5 %	312 nm
Gliceril p-aminobenzoato*	2-3 %	297 nm
CINAMATOS		
Cinoxato	1-3 %	310 nm

Octil-metoxicinamato		
SALICILATOS		
Homosalato	4-15 %	306 nm
Octil salicilato	3-5 %	307 nm
Trolamina salicilato	5-12 %	298 nm
OTROS		
Octocrileno	7-10 %	303 nm
Ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfónico	4-8 %	310 nm
Filtros químicos Ultravioleta B (UVB) y menos Ultravioleta A (UVA)		
BENZOFENONAS		
Dioxibenzona	3 %	288, 327 nm
2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona	2-6 %	288, 325 nm
Sulisobenzona	5-10 %	288, 325 nm
ANTRALINAS		
Mentil antralinato	3,5-5 %	286, 335 nm
Filtros químicos principalmente Ultravioleta A (UVA)		
Butil metoxi-dibenzoilmetano	2-3 %	358, 360 nm
3-(4-metilbencilideno) alcanfor	4 %	345 nm
Ácido tereftalideno-dialcanfor sulfónico	10 %	345 nm
Filtros químicos de amplio espectro		
Drometrizol-trisiloxano	15 %	303, 344 nm
Metileno bis-benzotriazolil	10 %	303. 368 nm
tetrametilbutilfenol		
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil	10 %	305, 340 nm
Filtros físicos o pantallas minerales		
Dióxido de titanio	2-25 %	400 nm
Óxido de cinc	20-25 %	400 nm

Fuente: Fotoprotección, Yolanda Gilaberte. Sección I Fotobiología. Fotodermatología. 2010 ⁽⁴⁶⁾.

2.4.4. Fotoprotectores inorgánicos

Estos tipos de fotoprotectores son minerales que nos protegen de la radiación mediante varios mecanismos. La mayor parte forman una barrera o capa protectora que refleja o disminuye las radiaciones que se irradia a nuestra piel por los rayos solares ⁽⁴⁶⁾.

Algunos de ellos es el dióxido de titanio, óxido de magnesio, óxido de zinc, mica entre otros. también se les conoce como filtros del tipo físico. Unos de los más usado son el dióxido de titanio y óxido de zinc los cuales protegen de las radiaciones tanto ultravioleta B (UVB) y ultravioleta A (UVA) ⁽⁴⁷⁾. Estos polvos inertes no generan sensibilización o irritación, sin embargo, nos dan una coloración media blanquecina lo cual no se ve muy bien estéticamente. Debido a ese motivo dentro de las formulaciones fotoprotectoras se disminuye su concentración. En las últimas presentaciones de estos polvos se ha ido disminuyendo su tamaño de partícula hasta llegar a tener unos polvos micronizado que ya no tienen la peculiaridad de darnos su coloración poco estética ^(48,49).

Se tiene también el óxido de hierro que dentro de sus propiedades ayuda a mejorar el aspecto cosmético para no tener la coloración blanquecina ^(50, 51, 52).

2.4.5. Antioxidantes e inmunofotoprotectores

Se conoce los efectos negativos que produce a nuestra piel los radicales libres y el daño oxidativo que genera, es por ello la importancia de los antioxidantes para contrarrestar dichos daños. Tenemos dentro de este grupo a antioxidantes que se consumen oralmente y otros que se aplican a la piel. Estos últimos de vía tópica tienen ventajas más marcadas ya que actúan directamente en la piel y con ello llegan a tener una mayor concentración. Estos tipos de antioxidantes son de una gran ayuda para nuestro organismo y complementa los propios antioxidantes que generamos ^(53, 54).

a) Vitamina C

Este tipo de antioxidante es muy utilizado desde hace mucho tiempo, esto se debe a su fácil acceso y que tiene propiedades que nos ayudan a prevenir los efectos negativos que nos genera la radiación tanto ultravioleta B (UVB) y

ultravioleta A (UVA). Cabe resaltar que especialmente actúa protegiéndonos de la radiación ultravioleta A (UVA) en mayor proporción. Su mecanismo de acción tiene dos formas, una ayudando al aumento del colágeno dérmico y otra proporcionando protección ante la peroxidación lipídica ^(55, 56, 57).

b) Vitamina E

Esta vitamina es una mezcla de varias sustancias en la cual resalta el α – tocoferol por su mayor potencia. La cual presenta una estructura de fase lipídica y se encuentra en mayor proporción en nuestro organismo ⁽⁵⁸⁾. Dentro de los beneficios que nos otorga es la protección frente a la radiación ultravioleta, en mayor grado frente a la radiación ultravioleta B (UVB). Dentro de su mecanismo de acción previene la generación de dímeros de pirimidina y también nos evita la inmunosupresión cutánea. Existe una relación estrecha con la vitamina C, la cual ayuda a la regeneración del α – tocoferol, por lo cual se recomienda que su administración se de en conjunto ^(59, 60, 61). Además de su capacidad antioxidante que posee el α – tocoferol, este compuesto presenta cierta capacidad de fotoprotección a nivel tópico, esto se da por tener un rango de absorción de radiación ultravioleta a unos 290 nm ^(62, 63).

c) Carotenoides

Son sustancias de naturaleza lipídica, estos compuestos se pueden encontrar en plantas, algas y en algunos casos bacterias. Dentro de este grupo podemos mencionar al B-caroteno, este es el principal antioxidante característico del grupo. Su mecanismo de acción se da por la inhibición que induce sobre la producción de radicales libre en procesos de fotooxidación. Además, nos protege de la radiación ultravioleta y eritemas que se puedan generar ⁽⁶⁴⁾. Otro compuesto de este grupo es la astaxantina el cual nos protege de la radiación ultravioleta por medio de inhibición de los radicales libres. Adicional a ello también ataca la formación de poliaminas libres que se dan por la radiación ultravioleta A (UVA), esto da una protección frente a las lesiones de fibroblastos ⁽⁶⁵⁾.

d) **Polifenoles del té verde**

Administrados tópicamente en seres humanos reducen el eritema y el edema cutáneo, así como la hiperplasia, la hiperqueratosis, el número de sunburn cells y los dímeros de pirimidina inducidos por la radiación ultravioleta ^(66, 67). Por estos efectos esta sustancia natural se está incorporando en muchos fotoprotectores ⁽⁶⁸⁾.

e) **Flavonoides**

Este grupo presenta propiedades antioxidantes ya que nos ayuda a la eliminación de radicales libres. Eso se da por su potencial de inhibición frente a la enzima tiroxinacinasa, estrogénicos y cierta capacidad fotoprotectora ⁽⁶⁹⁾.

1. **Genisteína.** Protege, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente al daño oxidativo, la apoptosis y la inmunosupresión inducidos por la radiación ultravioleta.
2. **Silimarina.** Consiste en una mezcla de tres flavonoides: silibinina, silidianina y silicristina. Su aplicación tópica en animales previene la formación de dímeros de pirimidina tras la exposición a radiación ultravioleta B (UVB) y reduce en un 92 % los tumores cutáneos inducidos por ésta.
3. **Isoflavonoides del trébol rojo.** Protegen frente a la inmunosupresión inducida por la radiación ultravioleta.
4. **Apigenina.** Inhibe significativamente el efecto carcinogénico cutáneo de la radiación ultravioleta en el animal de experimentación.

2.4.6. Excipientes.

Un punto muy importante en la formulación de un producto cosmético son el empleo adecuado de los excipientes, ya que estos nos ayudan como medio para la aplicación del activo. Adicional a ello la naturaleza de estos compuestos nos da las propiedades como resistencia al agua, el cual es muy importante cuando se elabora un fotoprotector. Existen diversos excipientes y cada uno puede aportar ciertas cualidades y mejoras en la fórmula, por ejemplo, el uso de aceites nos da mejor viscosidad y adherencia a la piel. Hay otros grupos como los colorantes, perfumes y conservantes.

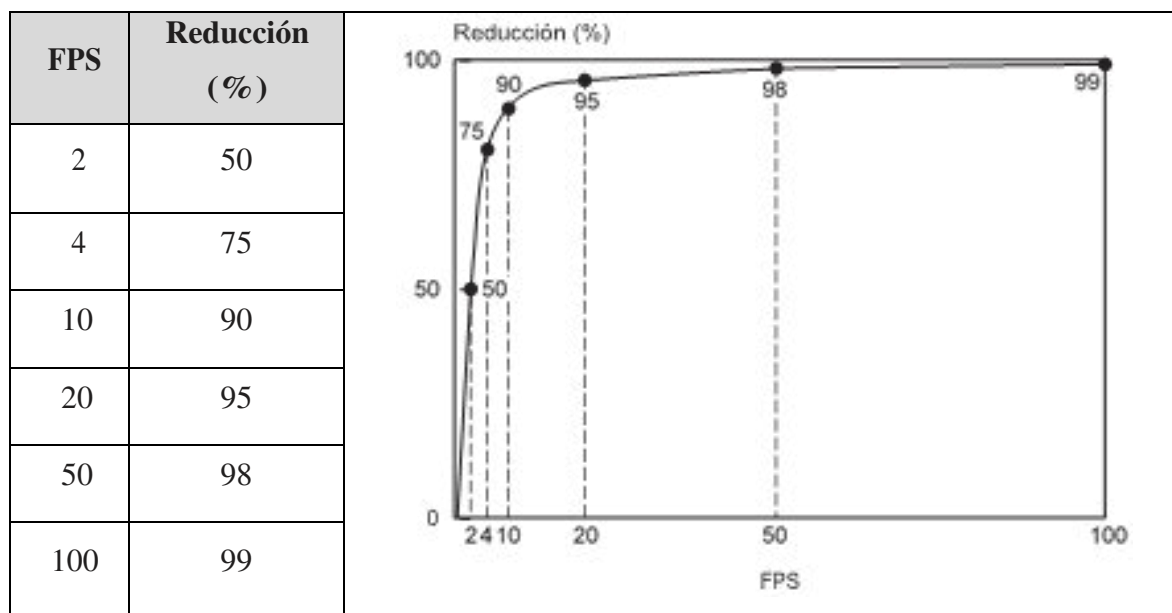


Figura N° 4: Curva del porcentaje de reducción de la radiación activa eritemática en función del factor de protección solar (FPS).

Fuente: Fotoprotección, Yolanda Gilaberte. Sección I Fotobiología. Fotodermatología. 2010 ⁽⁴⁶⁾.

Existen nuevos compuestos que están utilizando lo último en innovación, como son las nanopartículas. En este grupo tenemos a los lípidos sólidos que potencian el efecto fotoprotector y no solo es un vehículo para los activos.

Por otro lado, se tienen innovaciones como la microencapsulación de los fotoprotectores que nos da diversos beneficios en la formulación, como son una distribución homogénea en la piel, una mejor estabilidad, fácil formulación entre otros ⁽⁴²⁾.

2.5. Cosméticos

Un producto cosmético es una sustancia, preparado o formulación que se puede aplicar en diversas partes superficiales del cuerpo: piel, cabello, uñas, labios, dientes y la mucosa bucal.

Su objetivo es el de limpiar, perfumar, modificar su aspecto y proteger o mantener un buen estado y prevenir los olores corporales.

Se pueden presentar diversas formas cosméticas, como cremas o geles, entre otros. No son considerados cosméticos los preparados destinados a la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Ni los destinados a ser ingeridos, inhalados, inyectados o implantados ⁽⁷⁷⁾.

2.5.1. Formas cosméticas

Es la presentación de un producto cosmético para que su aplicación sea fácil y cómoda, y se asegure que la acción que se quiere conseguir, dependiendo de la zona a la que vaya destinada. Cada forma cosmética está determinada por los excipientes que contenga el producto ⁽⁷⁸⁾.

Entre las principales podemos citar:

- a) **Lociones:** son disoluciones transparentes que pueden ser coloreadas o no de producto disueltos en agua, alcohol, glicoles, o mezclas de ellos. Dentro de este grupo tenemos lociones, after shave, lociones capilares, tónicos, aguas de colonia, aceite bronceador, etc.
- b) **Emulsiones:** son mezclas de dos o más sustancias de distinta naturaleza, generalmente, agua y grasas, que se mantienen dispersas por mantener incorporado un emulgente. Podemos citar: cremas, leches, shampoo en crema, acondicionadores, etc.
- c) **Aerosoles:** son también envases a presión que contienen una mezcla de gas propelente y un líquido. La mezcla sale al exterior en forma de gotas muy finas al presionar una válvula. Ejemplos: lacas capilares, perfumes, ambientadores.
- d) **Geles:** son disoluciones coloidales, viscosas. Pueden ser transparentes.
- e) **Polvos:** son materiales sólidos, secos, en partículas muy finas, pueden presentarse en forma suelta o compactados. Ejemplos: polvos de talco, maquillaje en polvos compactos, etc.
- f) **Mascarillas:** son masas plásticas (deformables) y húmedas que se dejan secar después de ser aplicadas sobre la piel, adhiriéndose y modelando la forma o aportando una serie de principios activos, hidratantes, descongestivos, reafirmantes, etc.

- g) **Barra:** formas sólidas alargadas obtenidas por fusión en moldes. Se aplican en la piel por deslizamiento sobre áreas determinadas. Ejemplos: Existen barras de muchos tamaños, gruesa como las barras desodorantes (sticks, intermedias, como los lápices de labios y finas como los lápices de ojos, jabones)
- h) **Espumas:** Son dispersiones de gas más sólido o pueden ser también gas más líquido. Se presentan en envases a presión y se descargan al exterior por medio de un gas propelente, a través de una válvula. Ejemplos: Espumas de afeitar, acondicionadores capilares, productos solares, etc.

2.5.2. Perfil del Producto

Constituye la base de diseño para el desarrollo. Las consideraciones a tomar en cuenta en el perfil del producto se encuentran:

- a. Uso previsto
- b. La vía de administración.
- c. Atributos que afectan el desempeño del producto.
- d. Criterios de calidad apropiados para el producto. (por ejemplo, pH, olor, ausencia de partículas extrañas etc.)
- e. Sistema de cierre del envase.
- f. Debe de tener fácil aplicación.
- g. Estabilidad química y física.

2.5.3. Preformulación.

Se define como la investigación de las propiedades fisicoquímicas de un principio activo solo o cuando se combina con excipientes, con el objetivo de generar información útil para la formulación en el desarrollo de una forma cosmética.

Entre los aspectos previos a tener en cuenta en la etapa de preformulación son las características fisicoquímicas de las materias primas entre ellas están: las propiedades organolépticas, tamaño y forma de partícula, punto de fusión, estabilidad, compatibilidad con excipientes ^(78 y 81).

2.5.4. Desarrollo de formulación.

Se debe realizar un resumen describiendo el desarrollo de la formulación, incluyendo la identificación de aquellos atributos que son críticos para la calidad del principio activo en el producto, teniendo en consideración el uso previsto y vía de administración. La información procedente de diseños experimentales formales puede ser útil en la identificación de puntos críticos o variables que interactúan que podrían ser importantes para garantizar la calidad del producto. El resumen debe destacar la evolución del diseño de la formulación inicial del concepto hasta el diseño final. Por lo que el desarrollo de la formulación suministra la información básica sobre el principio activo, la formula y el impacto de los excipientes sobre el producto ⁽⁷⁷⁾.

Generalmente los datos informativos generados en estas actividades son:

- a. Preformulación, que contiene toda la caracterización física y química de principio activo.
- b. Formulación, que consiste en los estudios requeridos para que la combinación entre el principio activo, los excipientes y el envase resulte en un producto con las características físicas y químicas requeridas.
- c. Desarrollo de métodos de análisis específicos.
- d. Optimización de la formulación. Esta última fase va muy ligada a los resultados que se van obteniendo durante el desarrollo del proceso de elaboración.

El desarrollo de la formulación no puede considerarse completados hasta que todos estos factores considerados básicos hayan sido estudiados. Se puede aceptar que posteriormente se produzca cambios menores en la formulación, siempre que se compruebe que no ejercen efectos adversos sobre las características del producto.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Materiales

- Material de vidrio: probetas, fiolas, matraz, vasos precipitado
- Micropipetas de 200 uL y 1000 uL
- Papel toalla y filtro
- Espátulas metálicas
- Termómetro

3.1.2. Equipos

- Espectrofotómetro UV/VIS - Marca GREETMED Modelo NV203
- Estufa THERMOLYNE Modelo 9000
- Baño maría equipado con agitador magnético - SCORPION SCIENTIFIC.
- Balanza analítica - METTLER TOLEDO AG 204.
- Dispensor Ultraturax T25
- Baño termostático Memmert WNB 14
- Estufa esterilizadora UN450 Memmert
- Potenciómetro marca Mettler Toledo
- Autoclave eléctrica Marca All American Modelo 25X-240
- Incubadora modelo INE 400 Memmert

3.1.3. Reactivos

Dragendorff, Mayer, Shinoda, Cloruro férrico, gelatina, Lieberman Bouchardat, amoníaco, yodo, ácido clorhídrico, ácido acético glacial (Merck®), metanol (Merck®), ,1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH+), alcohol etílico 96%, agua bidestilada, agua destilada, metanol absoluto (Merck®), Trolox® (Sigma Aldrich®).

3.2. Material Biológico

3.2.1. Muestra Botánica

La muestra vegetal de *Bixa orellana* L. fue recolectada cerca al río Ucayali, en el distrito de Herrera, departamento de Loreto a 98 metros sobre el nivel del mar. Se seleccionó la muestra en condiciones óptimas con un grado de madurez media (sin ninguna evidencia de putrefacción o mal estado).

3.2.2. Animales de laboratorio

Se usaron ratas machos *Rattus rattus* de 8 semanas de edad con peso promedio 200 ± 20 g cepa Holtzmann provenientes del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud, y se mantuvieron en el bioterio del LID (laboratorio de investigación y desarrollo) en la Universidad Cayetano Heredia, con condicionamiento previo de 48 horas, con agua y alimento *ad libitum*, ciclo luz-día de 12 horas y temperatura de 22 a 26 °C.

3.3. Entidades donde se desarrolló la investigación

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se realizó la marcha fitoquímica. Así mismo, se utilizó el laboratorio y bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde se realizó la extracción de los compuestos y se llevó a cabo la prueba de fotoprotección con ratas frente a la exposición de radiación ultravioleta B.

3.4. Tipo de investigación

✓ Experimental – Analítico:

Durante la investigación se hicieron comparaciones entre grupos, un grupo experimental y un grupo de control.

✓ Prospectivo:

El inicio de la investigación coincide desde la parte de recolección de la planta hasta la evaluación en animales de experimentación. En el registro de la información se consideraron los hechos a partir de la fecha de estudio.

3.5. Flujograma del proceso de investigación

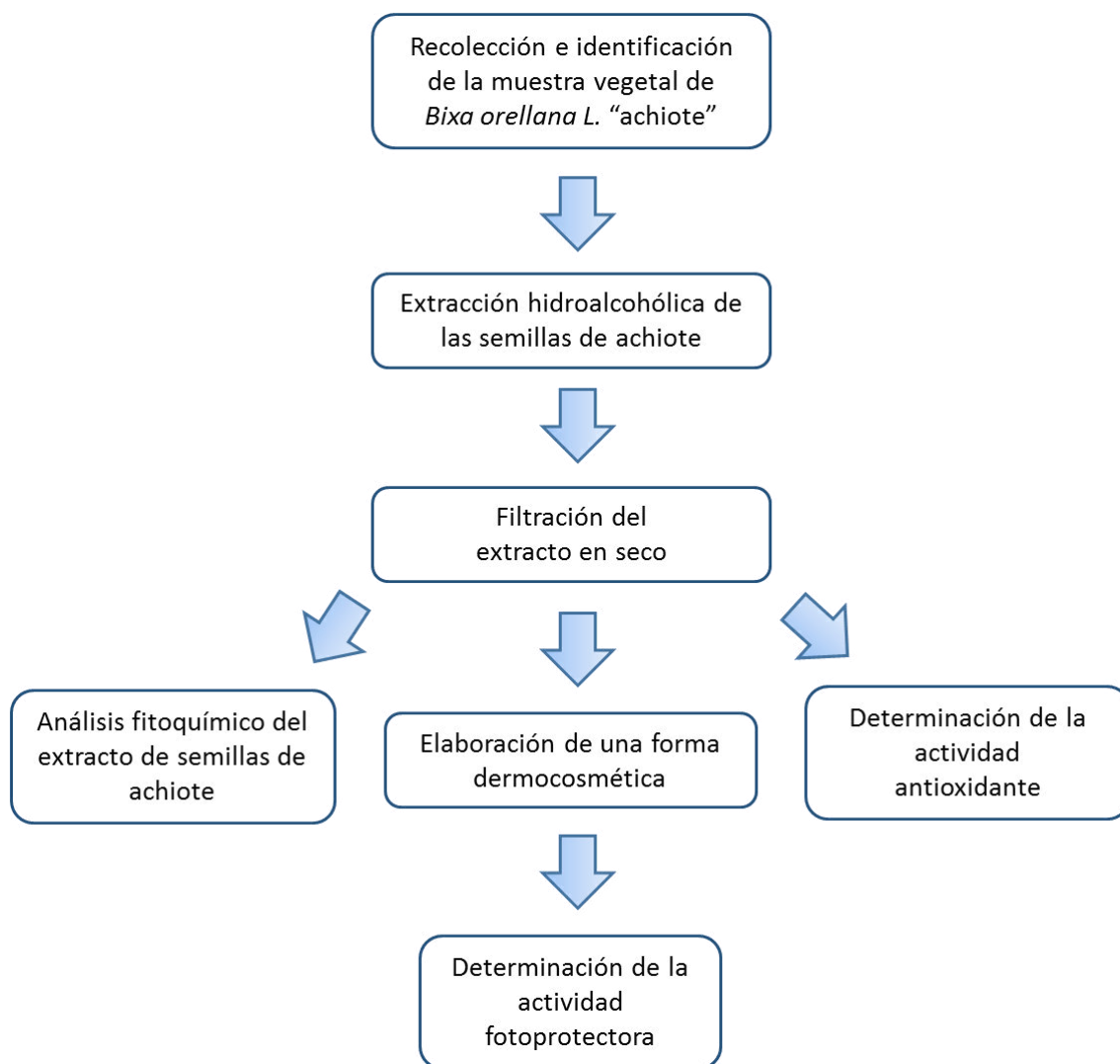


Figura N° 5: Esquema de la investigación

Fuente: Elaboración propia

3.6. Extracción de los activos

3.6.1. Recolección y elaboración de las muestras

En un primer momento se tuvieron los frutos mezclados que nos llegaron desde su recolección en la selva. Los frutos tenían en general buena apariencia y las que eran muy pequeñas o tenían algún signo de contaminación se retiraron del primer muestreo. Luego de la selección de los frutos, estos pasaron a la siguiente

fase que es la separación del capullo. En esta etapa se retiraron todas las semillas y se pusieron en un vaso de precipitado, que se dejaron reposar extendidas en papel Kraft durante 1 día para eliminar la humedad propia de las semillas. Posteriormente se recolectó una cantidad de 500 g de las semillas y se introdujo en 1 litro de alcohol al 96%, la cual se estuvo macerando por una semana y se agitó cada día dicho recipiente.

Finalmente se obtuvo una solución concentrada de coloración rojiza, la cual al término de la semana se le retiró las semillas con un colador. Dicha solución concentrada se llevó a estufa a unos 40° centígrados para eliminar lentamente el solvente. Una vez terminado la evaporación total del solvente, se cubrió con papel de aluminio y se llevó a condiciones de refrigeración.



Figura N° 6. Proceso de selección de frutos



Figura N° 7. Procesos de retiro de semillas

3.7. Identificación de grupos fitoquímicos

a) Alcaloides

Se pesaron 8 gramos de la muestra, se colocaron en un matraz Erlenmeyer. Luego se añadió ácido clorhídrico al 5% y se mezcló totalmente con la muestra. A continuación, se llevó a baño maría por unos cinco minutos. Se procedió a llenar en tubos de ensayo, una cantidad de 2 mL. Se debe observar si hay precipitado por lo menos en dos tubos de ensayo, de ser así se evidencia la presencia de alcaloides. Los reactivos utilizados son Mayer y Dragendorff.

b) Flavonoides

Se pesaron unos 8 gramos. Luego se añadió alcohol etílico y se llevó a calentar en baño maría por unos cinco minutos, con agitación constante. Se dejó enfriar y se filtró el contenido. Se añadió acetato de plomo al 4% y ácido acético 0,5%. Se agita y deja reposar por unos quince minutos. Para reconocer los flavonoides se añadió limaduras de magnesio al filtrado anterior. A continuación, se añadió lentamente unas gotas de ácido clorhídrico concentrado por las paredes del tubo de ensayo. Si se observa unos colores rojo-violáceos, rosado o naranja es evidencia de presencia de flavonoides. El reactivo que se utilizó es el de Shinoda.

c) Saponinas

Se agitó vigorosamente durante 1 minuto en un tubo de ensayo el filtrado acuoso anterior. La formación de espuma abundante y estable es prueba de la presencia de saponinas en la muestra.

d) Taninos

Se agregó 1 mL del filtrado acuoso en un tubo de ensayo y 1 ml del reactivo de gelatina-sal. Observar la presencia de precipitado, luego centrifugar a 2000 RPM durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante. Redisolver el precipitado en 2 mL de urea 10 M. añadir 2-3 gotas de cloruro férrico al 10 %. Si se observa precipitado al agregar el reactivo de gelatina, de coloración verde, azul o negro es prueba positiva de la presencia de taninos en la muestra.

e) Antocianinas

Se pesaron unos 100 gramos, luego se colocaron en un matraz Erlenmeyer. Se añadió unos 100 mL de agua, el cual se llevó a ebullición durante cinco minutos. Luego se procedió con la filtración. Se colocaron 2 mL del filtrado en un tubo de ensayo. A continuación, se agregó 1 mL de hidróxido de sodio diluido. Se debe observar si hay cambio de coloración ya que esto es positivo para presencia de antocianinas.

3.8. Determinación de la actividad antioxidante

3.8.1. Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

a) Fundamento

El método del uso del radical DPPH se basa en la reducción que se realiza luego que está expuesta a una sustancia antioxidante. Así mismo, esta reacción se puede cuantificar por medio de un espectrofotómetro UV a 517 nm, el cual pasa de tener una coloración morada a tener una coloración amarilla luego de reaccionar con el sustrato antioxidante ^(33 y 36).

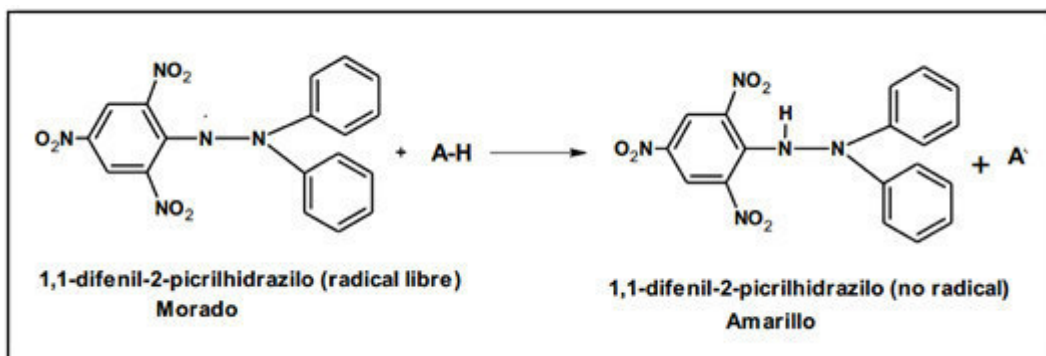


Figura N° 8. Antes y después de la reacción con el antioxidante (DPPH) ⁽⁴²⁾.

b) Procedimiento

Se preparó el radical DPPH a una concentración 20 mg/L en una solución de metanol. Luego se realizó varias soluciones del extracto en agua bidestilada a las siguientes concentraciones de 0,8 mg/mL; 1,6 mg/mL; 3,2 mg/mL; 6 mg/mL; 12 mg/mL. Las soluciones preparadas se cubrieron con papel aluminio para protegerlos de la luz y se conservó a una temperatura de 8°C hasta iniciar la prueba. También se preparó la muestra en blanco; se taparon todos los tubos con Parafilm, se agitaron y se dejaron reposar por 30 minutos en la oscuridad. Se leyeron en el espectrofotómetro UV a 517 nm ⁽²¹⁾.

El cálculo de la capacidad antioxidante se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{muestra (t)}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Dónde:

A_{DPPH} = Absorbancia del radical DPPH sin muestra de ensayo.

$A_{\text{muestra (t)}}$ = Absorbancia del radical DPPH con la muestra de ensayo en tiempo.

3.9. Desarrollo de la forma cosmética y su elaboración

3.9.1. Preformulación

En esta etapa se evaluó diversos criterios para la elaboración de la base dermocosmética, y se eligió realizar la preformulación de una crema. En primer lugar, se eligió los excipientes que nos den las características adecuadas para

tener una crema que nos sirva de base para añadir el extracto. Luego se analizó el procedimiento de elaboración, los pasos a seguir teniendo en cuenta las propiedades de los excipientes, como su compatibilidad y naturaleza química. Se consideró la viscosidad para la crema, ya que se requiere que tenga mayor adherencia en la piel que se le aplique ⁽⁴¹⁾.

3.9.2. Análisis de la elección de las materias primas

El extracto de *Bixa orellana* L., se incorporó porque tiene un alto porcentaje de carotenoides carboxílicos con una estructura básica similar a la del caroteno. Principalmente la bixina y norbixina, que tienen un grupo carboxílico libre y otro esterificado en el caso de la bixina, lo cual le da una buena solubilidad y estabilidad. Este es soluble en solventes como ácido acético y propilenglicol bajo condiciones normales. Se debe tener cuidado de exponerlo a la luz directa y a temperaturas altas ⁽⁵⁰⁾.

- a) El propilenglicol fue elegido por su propiedades emolientes e hidratantes lo cual ayuda a retener agua en un producto como cremas, productos solares entre otros. Y ser un buen disolvente dentro de la fase acuosa ⁽⁷⁸⁾.
- b) El preservante utilizado fue el DMDM hidantoina. El cual se encarga de evitar la proliferación de microorganismo y hongos, manteniendo conservado el producto evitando así su descomposición ⁽⁷⁸⁾.
- c) Se utilizó como quelante el edetato disódico que nos ayuda como estabilizante. Este estabilizador utilizado comúnmente evita cambios en la consistencia, olor y textura de productos de los cosméticos gracias a su función como un agente quelante, o capacidad de unirse con oligoelementos como minerales ⁽⁷⁸⁾.
- d) La goma xanthan es un polisacárido natural de alto peso molecular. Es fácilmente soluble en agua caliente o fría. Nos proporciona emulsiones estables con un tamaño de partícula uniforme ⁽⁷⁸⁾.
- e) El miristato de isopropilo tiene una baja viscosidad y excelente capacidad de extensión, así como un efecto hidratante para la piel y cabello, sin resultar graso ni pegajoso. Es adecuado para casi todos los productos cosméticos

donde favorece la penetración de los principios activos. Contempla un amplio rango de pH y es compatible con la mayoría de los excipientes ⁽⁷⁸⁾.

- f) El Monoestearato de glicerilo es un agente emulsificante aniónico para aceites, grasas, disolventes, y ceras, proporcionando emulsiones O/W. En cremas y lociones corporales mejora la sensación de suavidad y crea una capa sobre la piel que reduce la pérdida de agua ⁽⁷⁸⁾.
- g) El alcohol cetoestearílico se utiliza para espesar y darle consistencia a los productos cosméticos naturales. También nos da una sensación emoliente dejando la piel lisa y suave ⁽⁷⁸⁾.
- h) La trietanolamina es un agente emulsionante en aceite que se emplea como ingrediente para emulsionar cremas y productos cosméticos. Este compuesto además es ampliamente utilizado como regulador de pH y agente alcalinizante ⁽⁷⁸⁾.

Tabla N° 5 Resumen de las solubilidades de las materias prima.

Materia Prima	Solubilidad
Extracto de semillas de <i>Bixa orellana</i> L. “Achiote”	Soluble en agua y en alcohol.
Propilenglicol	Miscible en agua, alcohol y glicerina.
DMDM Hidantoína	Muy soluble en agua y solvente polares. Estable en rango pH 3 a 9
Edetato disodico	Soluble en agua
Goma Xanthan	Soluble en agua a temperatura mayor a 65° C
Miristato de isopropilo	Insoluble en agua. Soluble en compuestos grasos y aceites
Monoestearato de glicerilo	Insoluble en agua y soluble en alcohol.
Alcohol cetoestearílico	Insoluble en agua. Soluble en alcohol
trietanolamina	Soluble en agua

Fuente: Elaboración propia

3.9.3. Controles a la formulación

a) Características organolépticas

Las características organolépticas se expresan en relación al estado físico, color y olor de los cosméticos ⁽⁷⁷⁾.

Principio: El estado físico, color, olor se determina mediante la percepción del analista.

Procedimiento: Observación y percepción directa del producto.

b) Homogeneidad

Se verifica la ausencia de partículas. La determinación se efectúa colocando la muestra sobre una luna de reloj, placa Petri o papel glassin.

Procedimiento: Colocar una gota de la muestra en una parte de la luna de reloj, placa Petri o papel glassin de 2 cm por lado. Luego extender con una espátula y observar a la luz. No debe mostrar partículas.

c) Determinación de pH

Es la medida de acidez de una solución acuosa. Es decir, el pH de una solución determina si esta se comportará como un ácido o como una base, a través de la concentración de la especie receptora de electrones ⁽⁷⁷⁾.

El pH es la medición de la actividad de los iones hidrogeno mediante el uso de un electrodo patrón de hidrogeno y otro de referencia.

Procedimiento:

1. Colocar cada buffer en un beaker de 100 mL.
2. Leerlos en el orden siguiente: primero el buffer 7.00, luego el buffer 4.00 y el buffer pH 6.00, enjuagando con agua después de cada lectura.

Preparación de la muestra:

1. Mezclar 1 gramo del producto con 9 mL de agua en un beaker de 100 mL.
2. Determinar el pH de la mezcla resultante.

d) Viscosidad

La viscosidad determinada en este método se expresa en centipoises (cps).

La viscosidad se determina indirectamente en un viscosímetro ⁽⁷⁷⁾.

Procedimiento:

1. Usar un viscosímetro y nivelarlo.
2. Luego adaptar el Spin adecuado.
3. Colocar la muestra en un beaker de 600 mL y aplicar el número de revoluciones deseadas.
4. Observar la lectura en la escala.

e) Untuosidad

Se determina el poder de adhesión de la crema. La determinación se realiza aplicando una pequeña cantidad de la crema y observando su adhesión ⁽⁷⁷⁾.

Procedimiento:

1. Colocar una pequeña cantidad de producto sobre la piel de la mano o bien sobre la piel del antebrazo.
2. Extender y observar su adhesión.

3.9.4. Elaboración de la forma dermocosmética

Se realizaron diversas pruebas a distintas concentraciones del extracto de semillas de achiote, de las cuales se eligieron las preformulaciones que tenían el 1%, 3% y 8% del activo, con el fin de obtener resultados con diferencias significativas en cada concentración.

Se realizó en primer lugar la base de la crema y luego las cremas con los activos.

a) Componentes de la base

En la base se utilizaron componentes emulsificantes, que nos ayudaron a generar la crema. Así como otros que dan estabilidad a la misma, como son quelantes, humectante, emoliente, antioxidante, preservante y regulador del pH. Los componentes se detallarán más adelante en un cuadro.

b) Fórmula

Se utilizaron los siguientes componentes.

Tabla N° 6: Componentes de la fórmula

Ingrediente	INCI Name	Función
Agua	Water	solvente
Edetato de sodio	Tetrasodium edta	quelante
Goma xantana	Xanthan gum	emulsificante control de viscosidad
Propilenglicol	Propylene glycol	humectante
Trietanolamina	Triethanolamine	regulador de pH
Miristato de isopropilo	Isopropyl myristate	emoliente
Estearato de glicerilo	Glyceryl stearate	emoliente
Alcohol cetearílico	Cetearyl alcohol	emulsificante
Extracto de semilla de <i>Bixa orellana L.</i>	-	Activo fotoprotector
1,3-dimethylol-5,5- dimethyl-hydantoin	DMDM hydantoin	preservante

Fuente: Elaboración propia

Procedimiento

1. En un vaso de precipitado se agregó una cantidad de agua junto al quelante y se agitó. Luego se agregó propilenglicol y se procede a agitar. Seguidamente se debe calentar hasta 60°C.
2. Se adicionó la goma xanthan al recipiente principal y se procedió a mezclar hasta su total disolución.
3. En un recipiente auxiliar se puso todos los excipientes liposolubles y se llevó a una temperatura de 70 – 75°C.
4. Luego de tener los dos recipientes a una temperatura aproximada de 75 °C se añadió la fase oleosa a la solución principal. Para lograr una emulsión se utilizó el

homogeneizador a una velocidad alta y constante.

5. Se esperó que enfríe para continuar con el siguiente paso
6. A unos 40 °C se agregó el preservante, luego se mezcló y seguido se agregó el y seguidamente se mezcló hasta tener una crema homogénea sin grumos.
7. En el último paso se graduó el pH de la crema para que este dentro de las especificaciones propuestas, y se mide la viscosidad.

Finalmente se deja en reposo por aproximadamente una hora. Luego de enfriarse la crema se acondiciona en frascos de vidrio para ser almacenado.

Tabla N° 7. Especificaciones para la crema base

Ensayo	Parámetro	Especificaciones
Organoléptico	Color	Amarillo claro - anaranjado
	Olor	Sui generis
	Aspecto	Emulsión homogénea
Fisicoquímico	pH	6,5 – 8,5
	Viscosidad	3 000 – 9 000 cPs

Fuente: Elaboración propia

Se elaboró la crema base y los crema con extracto a diversas concentraciones.



Figura N° 9: Se observa la preparación de la crema base

Posteriormente las cremas se envasaron en frascos de vidrio.



Figura N° 10: Batería de cremas con diversas concentraciones

3.9.5. Estabilidad preliminar

Se almacenó las muestras a temperatura ambiente evitando el contacto con la luz solar y a una temperatura de 45° C. Los resultados se de la prueba se detallan en los anexos.

Luego se procedió a hacerle los correspondientes análisis en los respectivos tiempos.

Tabla N° 8. Condiciones de la estabilidad

Temperatura de Ensayo	Revisiones Parciales (días)				Duración del Estudio
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	
40°C +/- 1°C	0	30	60	90	120 días
25°C +/- 1°C	0	30	60	90	120 días

3.10. Evaluación de la acción fotoprotectora

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron animales de laboratorio, en particular se usaron ratas con las siguientes características:

- Especie: *Rattus rattus*
- Cepa: Holtzmann
- Sexo: macho
- Peso: 200 +/- 20 gramos

Estos animales fueron adquiridos en el bioterio del INS, luego se llevaron al bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde estuvieron en un ambiente de jaulas limpias, agua y comida *ad libitum*, y temperatura a unos 24°C.

Se utilizaron 35 ratas durante el estudio, las cuales fueron depiladas en todo el lomo donde se aplicaron las cremas tanto comerciales, base y con extracto. Los animales fueron separados en siete grupos de cinco cada uno, donde cada grupo se diferenciaba al ser uno control, blanco y las cremas elaboradas con el extracto del achiote.

Se aplicaron las cremas en el lomo de las ratas, unos 20 minutos antes de la exposición a la radiación ultravioleta durante los días de evaluación. Durante el estudio se realizaron observaciones macroscópicas de los efectos de la irradiación y lo que producía en la piel del animal. Los grupos fueron evaluados por separado y se llevó un detallado registro de las lesiones en la piel y su evolución. La exposición de la radiación fue durante cinco días.

En la última radiación se dejó pasar 2 horas, luego se procede a retirar las muestras de la piel del lomo con ayuda de un bisturí. Las muestras se llevaron a estudios histológicos y ver los efectos de la radiación y la protección que ejerce las cremas a prueba durante el estudio.

Diseño experimental:

Diseño de la investigación se formó siete grupos de 5 ratas *Rattus rattus* cada grupo. Distribuido aleatoriamente, que fueron sometidos a los siguientes tratamientos: Se aplicó vía tópica el tratamiento el extracto hidroalcohólico de semillas de achiote y luego fueron expuestas a radiación ultravioleta B (UVB) por 5 días.

Grupo N° 1: control blanco, no irradiados (piel intacta).

Grupo N° 2: control negativo, animales sometidos a la radiación sin tratamiento

Grupo N° 3: control positivo. animales sometidos a la radiación y con tratamiento de bloqueador comercial FPS 45

Grupo N° 4: animales sometidos a la radiación con tratamiento de crema base (sin extracto)

Grupo N° 5: animales sometidos a la radiación con tratamiento de crema al 1% del extracto.

Grupo N° 6: animales sometidos a la radiación con tratamiento de crema al 3% del extracto.

Grupo N° 7: animales sometidos a la radiación con tratamiento de crema al 8% del extracto.

Los animales se observaron minuciosamente inmediatamente luego de transcurrir el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta B (UVB).

Para la evaluación histológica se tomaron los lomos de los animales a fin de procesar dichos tejidos por las técnicas clásicas de hematoxilina-eosina.



Figura N° 11: Climatización de las ratas

Estudio histológico:

Luego del sacrificio del animal se retiró las muestras de piel del lomo, que tenían una longitud de 2 centímetros, se almacenaron en una solución buffer de formol al 10% por un día a 5° C. A las muestras histológicas se le hicieron cortes de unas 3 micras que se les aplicó tinción de hematoxilina – eosina, para luego ser leídas en láminas frente a un microscopio óptico.

3.11. Análisis estadístico

Los resultados son expresados en promedios para todas las mediciones obtenidas. Se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de

Tukey, con un nivel de confianza de 95 % ($p < 0.05$) empleando el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 23.

IV. RESULTADOS

4.1. Estudio Farmacognóstico

4.1.1. Análisis Organoléptico

Tabla 9: Parámetros físicos del extracto hidroalcohólico

Características	Resultados
Aspecto	Solido seco
Color	Rojo oscuro
Olor	Sui generis

Fuente: Elaboración propia

4.1.2. Marcha Fitoquímica

Tabla N° 10: Pruebas de identificación de metabolitos secundarios

Metabolito Secundario	Reactivo	Resultado
Alcaloides	Dragendorff Mayer	-
Flavonoides	Shinoda	+
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	+
Saponinas	Índice de espuma	-
Taninos	Gelatina	+
Esteroles y/o Triterpenos	Liberman - Buchardat	-
Antraquinonas	Bortranger	-
Antocianinas	HCl	+

Leyenda: (+) Positivo (-) negativo

Fuente: Elaboración propia

4.2. Características organolépticas y fisicoquímicas de la preformulación

Se analizó el aspecto, color, olor, pH y viscosidad de la preformulación. El aspecto fue una crema homogénea, el color de la preformulación, con diferentes concentraciones del extracto, fue de un color amarillo claro a anaranjado. La viscosidad fue medida con spindle 5 a 20 rpm por 1 minuto a 25° C; y su resultado fue de 5574 - 7820 cPs. El pH de las cremas se encontró entre 7 y 8.

Tabla N° 11: Resultados de las características organolépticas y fisicoquímicas

Características	Crema base	1%	3%	8%
Aspecto	Crema homogénea	Crema homogénea	Crema homogénea	Crema homogénea
Color	blanco	Amarillo claro	Amarillo rojizo	Anaranjado
Olor	Sui generis	Sui generis	Sui generis	Sui generis
pH	5,50	7,86	7,89	8,00
Viscosidad (cPs)	7820.00	5696.67	5740.00	5573.33

4.3. Determinación de actividad antioxidante

4.3.1. Prueba DPPH

Tabla 12: Resultados de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de semilla de achiote por el método de DPPH

Concentración Extracto (ug/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm	Desviación estándar	% inhibición
0	0,565	0,003	0
800	0,405	0,050	28,32
1600	0,362	0,010	35,93
3200	0,311	0,012	44,96
6000	0,265	0,007	53,10
12000	0,041	0,003	92,74
IC50			5,621

Fuente: Elaboración propia

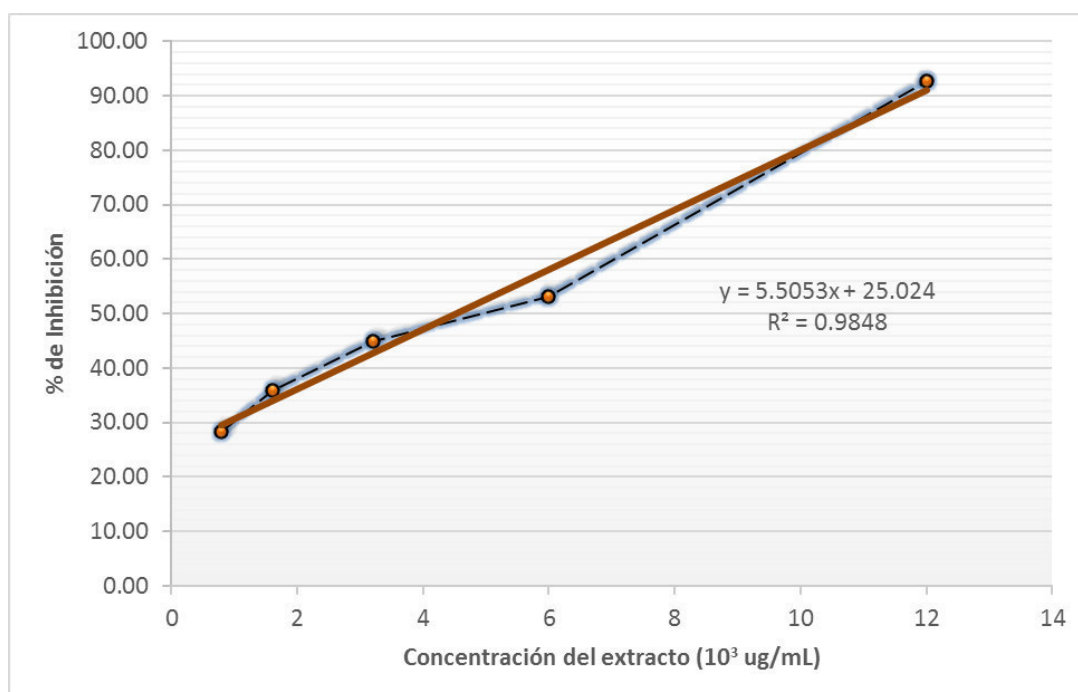


Figura 12: Gráfica % inhibición Vs concentración del extracto

Se logra observar que a medida que aumenta la concentración del extracto, hay un mayor porcentaje de inhibición del radical libre.

Método DPPH: “solución trolox”

Tabla 13: Resultados de la actividad antioxidante de trolox por el método DPPH

Concentración de Trolox (ug/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm	Desviación estándar	% inhibición
0	0,550	0,001	0
1,6	0,491	0,005	3,15
3,2	0,312	0,015	31,55
6,4	0,099	0,006	72,78
8	0,055	0,003	89,17
IC50			5,05

Fuente: Elaboración propia

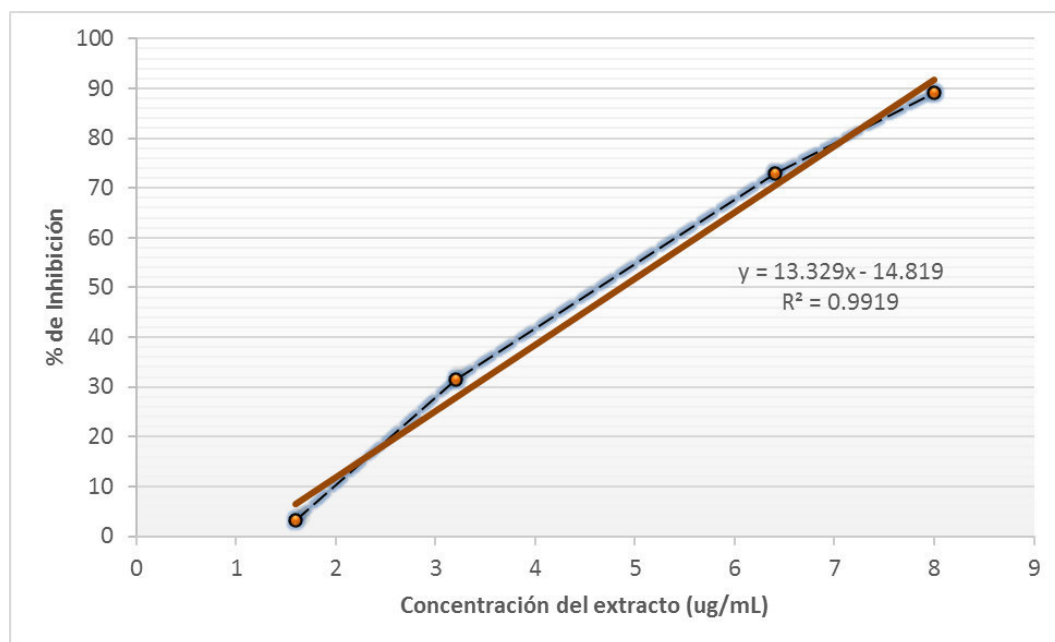


Figura N° 13: Gráfica % inhibición Vs concentración del estándar Trolox.

Se logra observar que a medida que aumenta la concentración del estándar Trolox, hay un mayor porcentaje de inhibición del radical libre.

4.4. Resultado del estudio de fotoprotección

Las observaciones realizadas a los animales al final de la exposición a la radiación ultravioleta B (UVB), nos da una preliminarmente a nivel macroscópico que existe cierta protección de parte de los grupos que han sido aplicados con las cremas.

En el grupo N° 3, N° 6 y 7 no se detectaron alteraciones graves. Se observaron algunas de las alteraciones de carácter leve.

Tabla 14: Resultados de evaluación macroscópica de la piel de ratas frente a la radiación ultravioleta B (UVB)

N° de Grupo	Evaluación macroscópica al final del tratamiento
Grupo N° 1: Control Blanco	Piel normal ya que no fue irradiado
Grupo N° 2: Control negativo (irradiado)	Intensa irritación con lesiones (muy perceptible)
Grupo N° 3: Control positivo (Bloqueador comercial)	Eritema (apenas perceptible)
Grupo N° 4: Crema Base	Irritación moderada (muy perceptible)
Grupo N° 5: Crema al 1%	Irritación moderada (poco perceptible)
Grupo N° 6: Crema al 3%	Ligera irritación (poco perceptible)
Grupo N° 7: Crema al 8%	Irritación muy superficial (apenas perceptible)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15: Resultados de evaluación histológica de la piel de ratas frente a la radiación ultravioleta B (UVB)

N° de Grupo	Observaciones
Grupo N° 1: Control Blanco	Se observó la piel sin alteraciones, histología conservada sin muestras de daño celular. Anexo 4.
Grupo N° 2: Control negativo (irradiado)	Se observó alteración (aumento) en el epitelio de la epidermis, produciéndose hiperproliferación celular con engrosamiento. Acantosis e hiperqueratosis severa. Queratinocitos apoptóticos en membrana basal. Infiltrado e inflamatorio severo. Anexo 5.
Grupo N° 3: Control positivo (Bloqueador comercial)	Se observó foco de acantosis y queratosis leve, lesión que no compromete al espesor del epitelio. Hay presencia de células atípicas solo en el estrato basal de la epidermis. Anexo 6.
Grupo N° 4: Crema Base	Se observó hiperproliferación epidérmica y daño epidérmico agudo atípico. Anexo 7.
Grupo N° 5: Crema al 1%	Se observó hiperproliferación epidérmica. Queratosis actínica moderada. Anexo 8.
Grupo N° 6: Crema al 3%	Se observó foco de acantosis e hiperqueratosis leve con presencia de células atípicas. No hay degeneración ni alteración del tejido conectivo denso. Anexo 9.
Grupo N° 7: Crema al 8%	Se observó foco de acantosis e hiperqueratosis leve. Sin lesión en el epitelio. Anexo 10.

Fuente: Elaboración propia

En los anexos se aprecian las fotos de la evaluación histológica.

V. DISCUSIÓN

En la marcha fotoquímica del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Bixa orellana* L., se encontró la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y antocianinas, tal como se observa en la tabla N°10, estos resultados obtenidos también fueron encontrados en un trabajo realizado por Colque G ⁷⁰ en el que se reporta la presencia de alcaloides, glucósidos, flavonoides, compuestos fenólicos en un extracto etanólico de semillas de achiote. En nuestro análisis fitoquímico realizado al extracto hidroalcohólico se evidencia la presencia de taninos utilizando el reactivo de gelatina. Con respecto a los taninos encontrados podemos decir que poseen una muy buena solubilidad en una mezcla al 50% de metanol en agua.

La especie *Bixa orellana* L., es utilizada como colorante alimenticio conocida como una planta tintórea. En el estudio de Gastaldi *et al.* nos indica que las plantas tintóreas tienen propiedades antioxidantes ligados a los compuestos fenólicos ⁽³³⁾. Según los resultados que se obtuvieron en la marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las semillas de achiote, se observó un resultado negativo para presencia de alcaloides. Sin embargo, según Troncoso H. el extracto acuoso y etanólicos de *Bixa orellana* L. (achiote); presenta metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos fenólicos y aminoácidos, no obstante, el extracto etanólico de hojas posee también compuestos fenólicos por el cual se considera su mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ⁽⁷⁶⁾.

En otros estudios, como el de Rivera R. *et al.*, se identificó ciertas propiedades antiinflamatorias que posee el achiote. Esto se da porque dentro de su composición además de flavonoides, también están los taninos y esteroides tanto en las hojas como en las semillas. Uno de los compuestos que está presente en las semillas es la bixina, que es un apocarotenoide ⁽²⁵⁾.

Se evaluó la actividad antioxidante total del extracto hidroalcohólico por el método in vitro DPPH*, donde se obtuvo una concentración inhibitoria (IC50) de $5,621 \times 10^3$ ug/mL este resultado obtenido en comparación con el resultado de la solución patrón Trolox (IC50) de 5,05 ug/mL demuestra poca actividad antioxidante del extracto

hidroalcohólico ya que a menor IC50 mayor será la actividad antioxidante, y menor será la cantidad de la muestra. En un estudio previo se encontró que el extracto de achiote presentaba carotenoides el cual tiene actividad antioxidante; por ejemplo, se ha evaluado los efectos de la norbixina sobre la lesión de las células de *Escherichia coli* DNA-inducido por radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y aniones superóxidos, y se encontró que la norbixina protege a las células contra estos agentes, incrementando su sobrevivencia en por lo menos 10 veces. Por otro lado, en el mismo estudio el extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. mostró un IC50 de 22,36 µg/mL en la prueba de DPPH, es decir mostró una actividad atrapadora de radicales libres (Shilpi J. y col., 2006) ⁽⁷⁴⁾.

En un estudio previo del extracto metanólico de hojas de achiote recolectado en el distrito de Compín, Gran Chimú- La Libertad, se obtuvo un valor de IC50 de 46.02 µg/mL. por el método de DPPH, estos resultados son atribuidos a la presencia de flavonoides, dando un valor de 1.15 gramos de quercitina por cada 10 gramos de hoja ⁽⁷³⁾. En otro estudio realizado por Rojas ⁽⁷¹⁾ proyecto N° 148 del FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010 reporta un IC50 de 10.65 µg/mL obtenido por el método de DPPH en un extracto metanólico de hojas de achiote, en comparación con nuestro resultado que presenta un IC50 de 5,621 x10³ µg/mL, el extracto metanólico de las hojas de achiote posee mayor actividad antioxidante que nuestro extracto hidroalcohólico de la semilla.

Meñaca *et al.* (2010) ⁽⁷²⁾ reporta una actividad antioxidante en el complejo de inclusión del extracto de semilla de achiote, la cual fue extraído por el método de fluidos supercríticos con el cual se puede controlar la presión y temperatura obteniendo un IC50 entre 23,55 µg/mL y 193.82 µg/mL las cuales fueron obtenidas a diferentes condiciones de extracción.

Esto puede deberse probablemente al tipo de solvente usado, así como también pueda deberse a la zona de cultivo y a los diversos factores ambientales ⁽⁷¹⁾.

Se decidió realizar una forma dermocosmética, y por las características del extracto se tuvo conveniente hacer una crema como vehículo del activo. En este desarrollo de la fórmula se utilizó un excipiente de base autoemulsionable. Este excipiente tiene la

particularidad que dentro de sus componentes tiene una fase oleosa y emulsificante; los cuales están mezcladas y de este modo ya no es necesario utilizar otro excipiente de naturaleza oleosa, tal como se observa en la tabla N° 5 y 6. En otro estudio realizado por Medina (2019) ⁽⁸²⁾ se utiliza también la crema como medio para probar la actividad fotoprotectora por sus diversos beneficios.

Figueroa G. (2016) ⁽⁵¹⁾ indica que las cremas son un buen medio para formulaciones fotoprotectoras, ya que éstas tiene propiedades que pueden vehiculizar los activos naturales tienen mejores propiedades sensoriales y es más cómodo para el usuario final.

Actualmente existe un crecimiento en la prevalencia de cáncer de piel generada por la exposición a los rayos ultravioleta B, esto puede prevenirse al evitar la sobreexposición de la radiación solar. La lesión generada por la radiación genera la formación de radicales libres, los que son considerados fuente para la generación de carcinogénesis que pueden ser disminuidas por el uso de antioxidantes ⁽⁷⁹⁾.

La coloración obtenida con los extractos al 3 % y 8 % eran más rojizas. Durante las pruebas y realización de las cremas se evidencio que la coloración de las cremas era estable y se mantenía sin cambios. La presencia de coloración en las semillas es debida a las sustancias adheridas a su superficie que en su mayor concentración son compuestos carotenoides como indica Leal *et al* (2010) ^(11 y 24).

Con respecto a la actividad fotoprotectora in vivo, de una preformulación podemos decir que no solo se debe a los filtros sintéticos o naturales presentes, sino también a los excipientes que pueden aportar efectos fotoprotectores a la formulación, ya que algunos absorben la radiación UV. Por lo expuesto anteriormente, se optó por realizar una misma base para adicionar las diferentes concentraciones de extracto y la crema base. Cabe aclarar que el presente estudio solo evaluó el rango correspondiente a la radiación ultravioleta B (290 a 320 nm) y no evaluó los rangos que corresponden a la radiación ultravioleta A ni la radiación ultravioleta C ⁽⁸⁰⁾.

Luego de las pruebas de fotoprotección e histológicas se obtuvo que las cremas al 3%

y 8% del extracto obtuvieron una buena capacidad de fotoprotección reduciendo el daño que generó la radiación ultravioleta B (UVB) en la piel y en los últimos días de la prueba generando cierta recuperación a nivel celular. Las concentraciones elegidas son similares a diversos estudios de investigación de extractos naturales tal como el de Moya y Osorio (2017) ⁽⁸³⁾ que indica que su formulación con extracto del fruto *Fragaria Vesca L.* al 5 % tiene efecto fotoprotector.

La capacidad de fotoprotección que tiene un producto esta determinado por diversos factores, uno de ellos es el tipo de forma cosmética que se utiliza como vehículo para incorporar el extracto. Y actualmente se está investigando las sinergias que tienen los extractos naturales en conjunto con filtros solares tradicionales, la cual se conoce como efecto “Booster” ⁽⁸⁴⁾.

Según indica Giraldo J. 2014 ⁽¹⁶⁾ la radiación ultravioleta (UV) en nuestra piel y organismo produce fotoenvejecimiento prematuro hasta un severo cáncer de piel. Esto se da por que la radiación afecta a nivel celular, como a los nucleótidos y ácidos nucleicos. Estas moléculas a verse afectadas por la radiación ultravioleta pueden fomentar la liberación de radicales libres. Tal como se observó en nuestro estudio en los grupos experimentales N° 2 y 4 en los análisis histológicos detallado en la tabla N° 15.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote” mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH presentó un IC50 de $5,621 \times 10^3$ ug/mL mientras que el trolox tiene un IC50 5.05 ug/mL. por lo que el extracto no presentó actividad antioxidante significativa
2. Se elaboró con éxito la preformulación de una forma dermocosmética al 1 %, 3 % y 8 % del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote”.
3. Las cremas al 3 % y 8 % del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Bixa orellana* L. “achiote” aplicadas en la piel de ratas expuestas a la radiación ultravioleta B (UVB) evaluados en un análisis histológico presentó efecto fotoprotector significativo.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar el estudio en otros tipos de preformulaciones dermocosméticas, con el fin de registrar el desempeño de los metabolitos secundarios en estos vehículos.
- ✓ Continuar con el estudio de la actividad antioxidante del extracto de *Bixa orellana* L. “achiote” con otros métodos de extracción.
- ✓ Incorporar el extracto de *Bixa orellana* L. “achiote” en preformulaciones con filtros solares comerciales y evaluar si existe sinergia entre ambas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bussmann R, Sharon D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía-La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Ethnobotany Research and Applications*, 2018, vol. 15, p. 1-293.
2. Pineda J, Calderón L. Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). *Revista Universidad EAFIT*, 2012, vol. 39, N° 131, p. 8-22.
3. Lock O. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Capítulo IV. Manual de fitoterapia. EsSalud/OPS, 2001.
4. Jara C, Saavedra E, *et al.* Obtención de un colorante natural de las semillas de *Bixa orellana* L. (Bixaceae) como alternativa para uso cosmético. *ARNALDOA*, 2016, vol. 23, N° 1, p. 149-158.
5. Agapito F, Sung E. Fitomedicina. 1100 Plantas Medicinales II. Lima. Perú: Editorial Isabel, 2004, p. 305.
6. Huamán O, Sandoval M, *et al.* Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas. En *Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM. Facultad de Medicina*, 2009. p. 97-102.
7. Salaverry O, Cabrera J. Florística de algunas plantas medicinales. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2014, vol. 31, p. 165-168.
8. Duke J. *Amazonian ethnobotanical dictionary*. CRC press, 1° edición, Iquitos – Perú 2018.
9. Ayme Y. Estudio etnobotánico y etnofarmacológico de plantas medicinales de Tambopata, Madre de Dios, Perú. *Ciencia y Desarrollo*, 2011, vol. 14, p. 7-26.
10. Quiñones X, Yunda C. El Achiote *Bixa orellana* L. como posible alternativa productiva para el departamento del Meta. *Rev Sist Prod Agroecol*, 2014, vol. 5, N°1.
11. Meñaca E. Preparación y determinación de la actividad antioxidante de un complejo de inclusión del pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L) y B-ciclodextrina. *Revista de la Universidad del Valle-Facultad de Ciencias. Colombia*, 2010.
12. Pérez S, Cuen M, Becerra R. El achiote. *Biodiversitas*, 2003, vol. 46, N°1, p. 7-11.
13. Yu R, Mandlekar S, Kong A. Molecular mechanisms of butylated

- hydroxylanisole-induced toxicity: Induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular pharmacology*, 2000, vol. 58, N°2, p. 431-437.
14. García L, Vicente L, *et al.* Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 2001, vol. 20, N°3, p. 231-235.
 15. Erlejman A, *et al.* The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free radical research*, 2004, vol. 38, N°12, p. 1311-1320.
 16. Giraldo J, Atehortúa L, Puertas M. Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 2014, vol. 12, N°4, p. 272-281.
 17. “Comisión de la Comunidad Andina. DECISION 833. Armonización de Legislaciones en materia de Productos Cosméticos. Gaceta Oficial del Acuerdo de Cartagena N°. 797 del 28 de setiembre de 2018”
 18. Enciso J, Amiel J, *et al.* Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro plantas medicinales y estimulación de la proliferación de fibroblastos. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2010, vol. 76, N°1, p. 73-79.
 19. Bernal H, Correa J. Especies Vegetales Promisorias de los países del Convenio Andrés Bello, Tomo X. Guadalupe, Bogotá, Colombia, 1994.
 20. Avendaño C, Pinzón L, *et al.* Rescate y conservación del Achiote (*Bixa orellana* L.) en México. *Agroproductividad*, 2012, vol. 5, N°4, p. 3-9.
 21. Castro A. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis de doctor en Farmacia y Bioquímica]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2008
 22. Fiallo V. Apuntes para la flora económica de Cuba V. Plantas tintóreas. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 2002, p. 91-113.
 23. Moreira P, Lins J, *et al.* The domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. *Economic botany*, 2015, vol. 69, N°2, p. 127-135.
 24. Leal F, De Clavijo C. Acerca de la Historia, Taxonomía, Botánica y usos de *Bixa orellana* L. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 2010, vol. 28, p. 78-86.
 25. Rivera R, Aguilar M, *et al.* Carotenoid derivatives in achiote (*Bixa orellana*)

- seeds: synthesis and health promoting properties. *Frontiers in plant science*, 2016, vol. 7, p. 1406.
26. Bittencourt C, Felicissimo M, *et al.* Study of annatto from *Bixa orellana* seeds: an application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Spectroscopy Europe*, 2005, vol. 17, N°2, p. 16-22.
 27. Satyanarayana A, Prabhakara P, Rao D. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 2003, vol. 40, N°2, p. 131-141.
 28. Sepúlveda C, Gómez C, *et al.* Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L.(achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2016, vol. 21, N°2, p. 133-144.
 29. Paladino S, Zuritz C. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 2011, vol. 43, N°1, p. 187-199.
 30. García B, Saldaña A, Saldaña L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 2013, vol. 12, N°2, p. 187-196.
 31. Tegeli V, Karpe P, Katve V. Importance of free radical and antioxidant on human health. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 2014, vol. 4.
 32. Vidal A, Fallarero A, *et al.* Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, vol. 42, N°4, p. 589-600.
 33. Gastaldi B, Assef Y, *et al.* Actividad antioxidante en infusiones, tinturas y aceites esenciales de especies nativas de la Patagonia Argentina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2016, vol. 21, N°1, p. 51-62.
 34. Repo R, Encina C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2008, vol. 74, N°2, p. 108-124.
 35. Mosquera O, Niño J, *et al.* Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et technica*, 2005, vol. 1, N°27.
 36. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to

- evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 1995, vol. 28, N°1, p. 25-30.
37. Doroteo V, et al. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú, 2013, vol. 79, N°1, p. 13-20.
 38. Castro A, Juárez J, Suárez S, et al. Efecto antioxidante y antifotoenvejecimiento de extractos de la macroalga del litoral peruano de *Macrocystis integrifolia* bory y elaboración de una forma dermocosmética. Ciencia e investigación, 2014, Vol. 17, N°2, P. 80-87.
 39. Doroteo V, Terry C, et al. Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). Revista de la Sociedad Química del Perú, 2012, vol. 78, N°4, p. 254-263.
 40. Vega O. Cosmética solar: el envejecimiento prematuro y la protección solar. Ciencia y Salud Virtual, 2011, vol. 3, N°1, p. 123-134.
 41. Arellano I, Alcalá D, et al. Recomendaciones clínicas para la fotoprotección en México. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica, 2014, vol. 12, N°4, p. 243-256.
 42. Honeyman J. Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. Rev. Peru. Dermatol, 2002, vol. 12, N°2.
 43. Moreno M, Moreno L. Fotoprotección. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica, 2010, vol. 18, N°1, p. 31-39.
 44. Morales-Molina J, Grau S, et al. Quemaduras solares: fotoprotección y tratamiento. 2006.
 45. Escamilla P, Agulles M, Timor A. Protección solar: ¿cuál es el factor óptimo? Más dermatología, 2008, N°5, p. 21-24.
 46. Gilaberte Y, González S. Novedades en fotoprotección. Actas Dermo-Sifiliográficas, 2010, vol. 101, N° 8, p. 659-672.
 47. Pinnell S, Fairhurst D, et al. Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium dioxide. Dermatologic surgery, 2000, vol. 26, N° 4, p. 309-314.
 48. Moyal D, Chardon A, Kollias N. UVA protection efficacy of sunscreens can be determined by the persistent pigment darkening (PPD) method: (Part 2).

- Photodermatology, photoimmunology & photomedicine, 2000, vol. 16, N° 6, p. 250-255.
49. Serpone N, Dondi D, Albini A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*, 2007, vol. 360, N° 3, p. 794-802.
 50. Cargnoni G, Fonovich T. Colorantes utilizados en cosméticos y productos de higiene personal: análisis de productos y de la legislación vigente. *Bifase*, 2012, vol. 25, p. 53-63.
 51. Figueroa G, Méndez C, *et al.* Medición del color en productos cosméticos elaborados con subproductos de la grana cochinilla. *Acta Universitaria*, 2016, vol. 26, N° 1, p. 3-7.
 52. Ramírez J, et al. Colorantes y pigmentos microbianos en la belleza cosmética. 2015.
 53. Puentes J, Hurrell J. Plantas andinas y sus productos comercializados con fines medicinales y alimentarios en el Área Metropolitana Buenos Aires-La Plata, Argentina. 2015.
 54. Aubin F. Fotoinmunología: Efectos inmunológicos de la radiación ultravioleta e implicaciones en dermatología. *EMC-Dermatología*, 2003, vol. 37, N° 1, p. 1-8.
 55. De Villegas E, et al. Radiación ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. *MediSur*, 2005, vol. 3, N°1, p. 14-33.
 56. García M, Galván S. Antioxidantes y pelo. *Dermatol Rev Mex*, 2015, vol. 59, p. 421-429.
 57. Amores C, Benavides P. Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 2018, vol. 59, N°2, p. 77-84.
 58. “Morales-Molina J, Jiménez-Martín J. et al. Quemaduras solares: fotoprotección y tratamiento. *Ars Pharm.* 2006; 47(2): 119”
 59. Honorato J. Los procesos de glicación y oxidación en el envejecimiento de la piel. *Med Cutan Iber Lat Am*, 2010, vol. 38, N° 2, p. 101-104.
 60. Gajardo S, Benites J, *et al.* Astaxantina: antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en cosmética. *Biofarbo*, 2011, vol. 19, p. 6.
 61. Prieto L. Romper el proceso del envejecimiento cutáneo: activos dermocosméticos. *Med Cutan Iber Lat Am*, 2010, vol. 38, N° 2, p. 95-100.

62. De Villegas E, Menéndez M, *et al.* Radiación ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. *MediSur*, 2005, vol. 3, N°1, p. 14-33.
63. Junes R. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro y efecto regenerador in vivo de una crema cosmética con extracto liofilizado de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). 2017.
64. Enriquez M. Evaluación de la Actividad Cicatrizante, Fotoprotectora y Antioxidante de las Diferentes formas Farmaceuticas Tópicas Elaboradas a Base del Extracto de *Chlorophyta acuática* “Ilaska” en *Cabia porcellus* “Cobayos”. 2018.
65. López A, Lazarova Z, *et al.* Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM (Impresa)*, 2012, vol. 6, N° 1, p. 48-53.
66. Copia J, *et al.* Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella sp.* *Latin american journal of aquatic research*, 2012, vol. 40, N° 1, p. 113-123.
67. García B, Saldaña A, Saldaña L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 2013, vol. 12, N° 2, p. 187-196.
68. Alonso A, Almeida E. Las plantas como radioprotectores potenciales frente a la radiación ionizante. *Nucleus*, 2008, N° 44, p. 3-7.
69. Martino V. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2000, vol. 19, N° 4, p. 303-308.
70. Colque G. (2019). Evaluación de la capacidad fotoprotectora, determinación del FPS e irritación primaria en piel de ratones de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de las semillas de *Bixa Orellana* (Achiote) [Tesis de pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2019.
71. Rojas R., Doroteo V., Díaz C. Actividad antioxidante, anti-elastasa, anti-colagenasa, Protectora contra rayos UV-B, promotora de síntesis de Colágeno in vitro y estudios de seguridad/eficacia de extractos de *Bixa orellana* (“achiote”) y *oenothera rosea* (“chupasangre”). *Revista de la Universidad Peruana Cayetano Heredia*. Lima. 2010
72. Meñaca, O.; Restrepo, O y Colmenares, A. Actividad antioxidante del complejo

- de Inclusión del extracto de semilla de *bixa orellana* en B-ciclodextrina obtenido por CO₂ supercrítico. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle, Colombia. 2010
73. Barros D., Dominguez L., Capacidad antioxidante in vitro de los flavonoides totales obtenidos de las hojas de *Bixa orellana* (achiote). [Tesis para optar el título profesional de Bioquímica Farmacéutica]. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. 2013
 74. Shilpi J. Taufiq-Ur-Rahman M., Uddin SJ. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. Leaves J. Ethnopharmacol. 2006; 108 (2):264-71
 75. Alarcón J, et al. Recolección seminal intracapsular, una variable a considerar en la germinación in vitro de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.), planta con actividad antiofídica. vitae, 2005, vol. 12, N° 2, p. 29-35.
 76. Troncoso, H. Evaluación de la actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria y concentracion bactericida minima in vitro de los extractos acuoso y etanólico de hojas y corteza de achiote (*Bixa orellana* L.), frente al crecimiento de escherichia coli, klebsiella oxytoca, proteus mirabilis, pseudomona aeruginosa y staphylococcus aureus [Tesis de pregrado]. Arequipa. Universidad Católica de San María; 2014.
 77. Gámiz Mari; Leyva Jesús. Formulación magistral. Ediciones Paraninfo, SA, 2005.
 78. Carrasco F. Diccionario de Ingredientes Cosméticos 4a ed. Francisco Carrasco Otero, 2009.
 79. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. Brasilia: ANVISA; 2005
 80. Kramer-Stickland K, Liebler D. Effect of UVB on Hydrolysis of a-Tocopherol Acetate to a-Tocopherol in Mouse Skin. J Invest Dermatol. 1998;3(2):302-7.
 81. Schalka S., Steiner D., Ravelli F., Steiner T., Terena A., Marçon C., et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2014; 89(6): 1-74.
 82. Medina K, Echaiz M. Actividad antioxidante y fotoprotectora UVB in vitro de una crema dermocosmética elaborada con el extracto acuoso liofilizado del tubérculo de *Dioscorea trifida* L.f. (sacha papa morada). [Tesis para optar el

Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2019.

- 83.** Medina K, Echaiz M. Actividad fotoprotectora de formulación tópica a base del extracto hidroalcohólico de *Fragaria vesca* L. (fresa). [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2017
- 84.** Saraf S., Kaur CD. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetics formulations. *Pharmacognosy Reviews*. 2010; 4(7): 1-11

IX. ANEXOS


ANEXO N° 1

Planta *Bixa orellana* L. “achiote”




ANEXO N° 2

Clasificación taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N°381-USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fruto) recibida de **Carlos Augusto YARIN CARRIZALES**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Bixa orellana* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1998).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: MALVALES

FAMILIA: BIXACEAE

GENERO: *Bixa*


ESPECIE: *Bixa orellana* L.


Nombre vulgar: "achiote"

Determinado por: Blgo. Mario Benavente Palacios.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 17 de diciembre de 2014




Dra. HAYDEE MONTOYA TRILLOS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono: (511) 471-0117, 470-4471
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

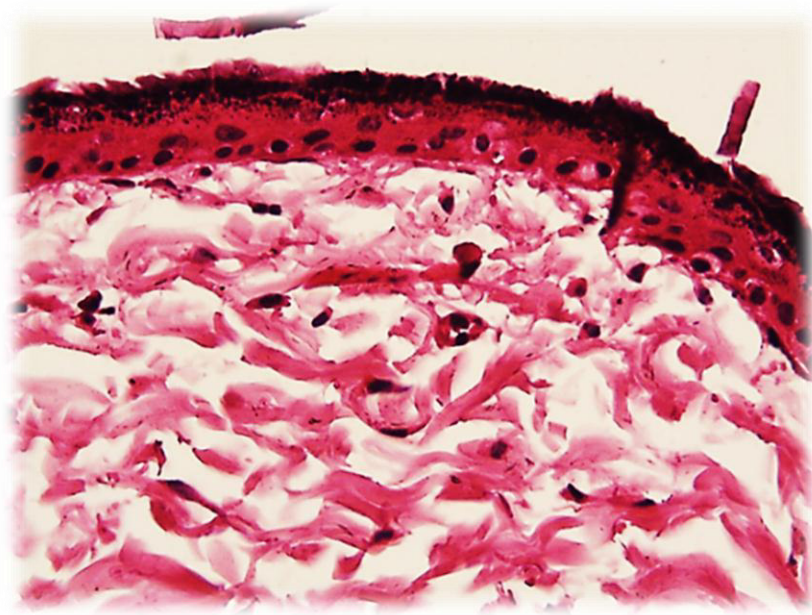
ANEXO N° 3

Bioterio donde se realizó tubo a las ratas durante todo el estudio.



ANEXO N° 4

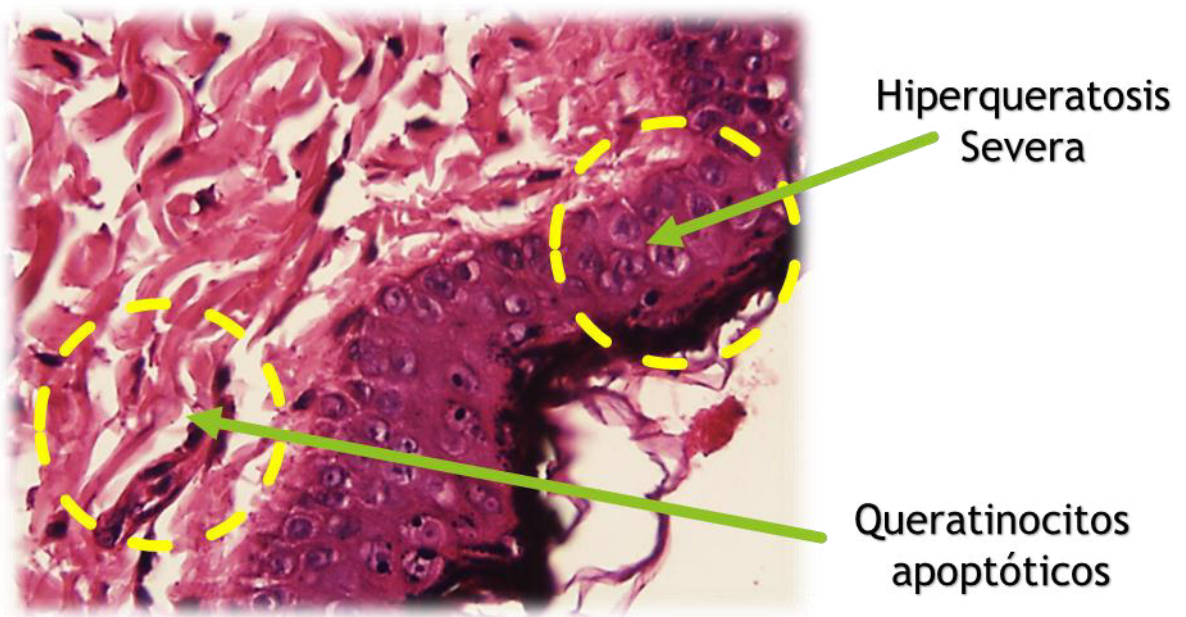
Grupo N° 1: Control Blanco. Se observa la piel sin alteraciones, histología conservada sin muestras de daño celular.



Toma fotográfica de cortes histológicos correspondientes a la piel no tratada, ni irradiada.

ANEXO N° 5

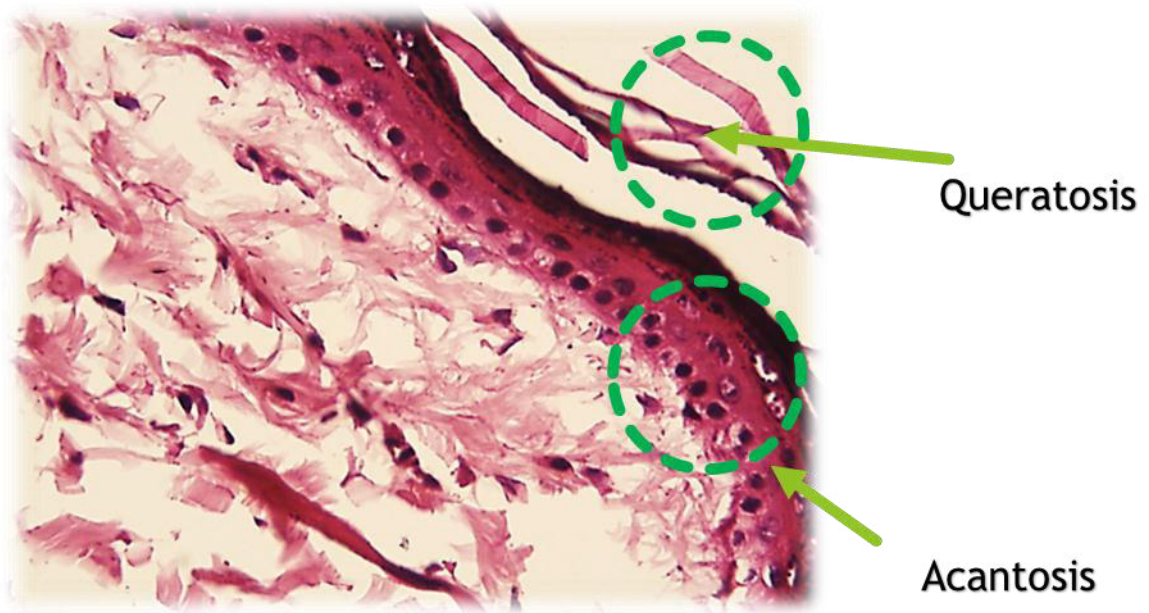
Grupo N° 2: Control negativo: Se observa alteración (aumento) en el epitelio de la epidermis, produciéndose hiperproliferación celular con engrosamiento. Acantosis e hiperqueratosis severa. Queratinocitos apoptóticos en membrana basal. Infiltrado e inflamatorio severo.



Toma fotográfica del corte histológico de la piel irradiada y no tratada.

ANEXO N° 6

Grupo N° 3: Control positivo (bloqueador solar comercial SPF 45): Se observe foco de acantosis y queratosis leve, lesión que no compromete al espesor del epitelio.



Toma fotográfica del corte histológico de la piel irradiada y tratada con bloqueo solar comercial.

ANEXO N° 7

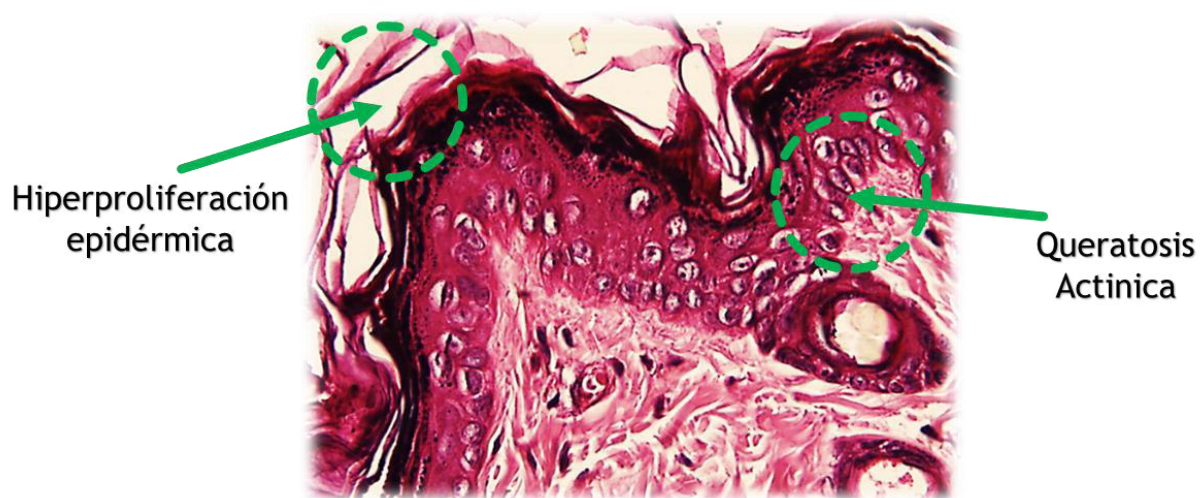
Grupo N° 4: Crema base. Se observó hiperproliferación epidérmica.



Toma fotográfica del corte histológico de la piel irradiada y tratada con la crema base

ANEXO N° 8

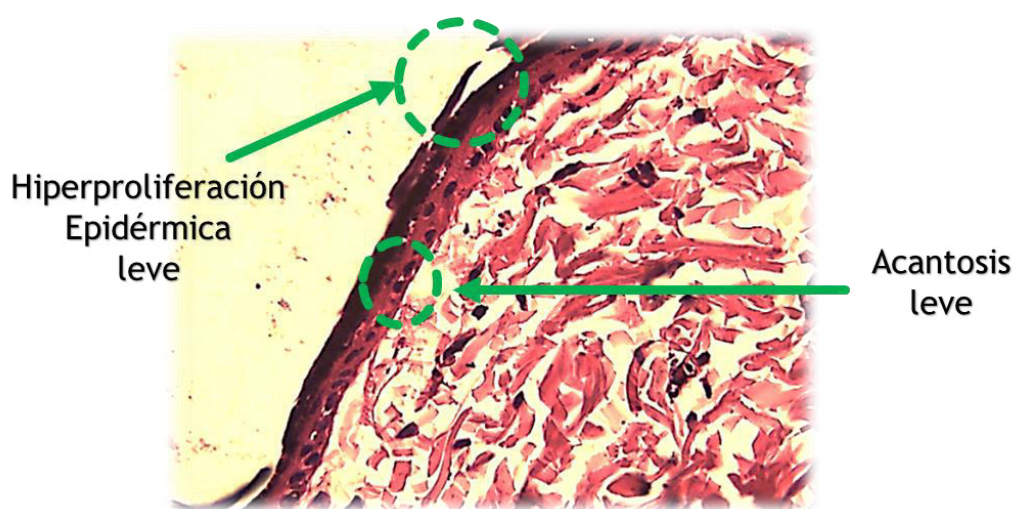
Grupo N° 5: Crema 1%. Se observó hiperproliferación epidérmica y leve daño epidérmico agudo atípico. Mitosis intraepidérmicas concordantes con queratosis actínica leve y moderada.



Toma fotográfica del corte histológico de la piel irradiada y tratada con formulación al 1%.

ANEXO N° 9

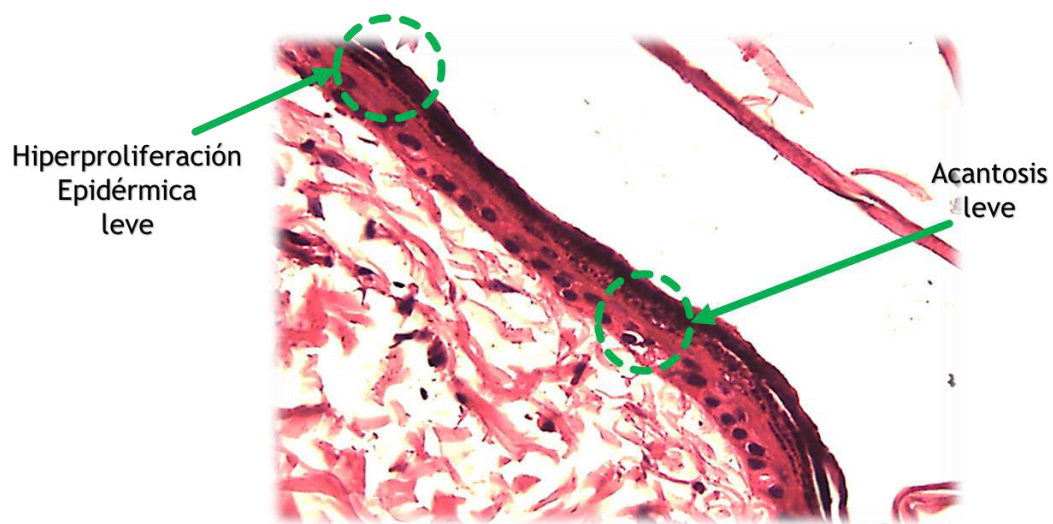
Grupo N° 6: Crema 3%. Se observe foco de acantosis e hiperqueratosis leve con presencia de células atípicas. No hay degeneración ni alteración del tejido conectivo denso.



Toma fotográfica del corte histológico de la piel irradiada y tratada con formulación al 3%.

ANEXO N° 10

Grupo N° 7: Crema 8%. Se observó foco de acantosis e hiperqueratosis leve. Sin lesión en el epitelio.



Toma fotográfica del corte histológico de la piel irradiada y tratada con formulación al 8%.

ANEXO N° 11

Evaluación de las características de la crema al 1 % a una temperatura de 40 °C
± 2 °C.

ANÁLISIS ORGANOLEPTICO Y FISICOQUIMICO					
PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃
Aspecto	Emulsión Homogénea	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Color	Amarillo claro	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Olor	Sui generis	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Viscosidad (Directo, Viscosímetro Brookfield RVT)	3000 - 9000 cPs Aguja # 5, 20 RPM, 25°C, 1 min.	5696 cPs	4793 cPs	3643 cPs	3623 cPs
pH (Directo a 25°C)	6.50 - 8.50	7.86	7.74	7.71	7.71
Resultados	No se observaron parámetros organolépticos, fisicoquímicos fuera de especificaciones durante la duración del ensayo. Las muestras se mantuvieron estables en las condiciones del ensayo.				

ANEXO N° 12

Evaluación de las características de la crema al 3 % a una temperatura de 40 °C
± 2 °C.

ANALISIS ORGANOLEPTICO Y FISICOQUIMICO					
PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃
Aspecto	Emulsión Homogénea	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Color	Amarillo claro	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Olor	Sui generis	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Viscosidad (Directo, Viscosímetro Brookfield RVT)	3000 - 9000 cPs Aguja # 5, 20 RPM, 25°C, 1 min.	5740 cPs	4060 cPs	3873 cPs	3853 cPs
pH (Directo a 25°C)	6.50 - 8.50	7.89	7.77	7.76	7.75
Resultados	No se observaron parámetros organolépticos, fisicoquímicos fuera de especificaciones durante la duración del ensayo. Las muestras se mantuvieron estables en las condiciones del ensayo.				

ANEXO N° 13

Evaluación de las características de la crema al 8 % a una temperatura de 40 °C
± 2 °C.

ANALISIS ORGANOLEPTICO Y FISICOQUIMICO					
PARAMETRO	ESPECIFICACIONES	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃
Aspecto	Emulsión Homogénea	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Color	Amarillo claro	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Olor	Sui generis	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Viscosidad (Directo, Viscosímetro Brookfield RVT)	3000 - 9000 cPs Aguja # 5, 20 RPM, 25°C, 1 min.	6863 cPs	6040 cPs	5130 cPs	5103 cPs
pH (Directo a 25°C)	6.50 - 8.50	8.13	7.91	7.88	7.87
Resultados	No se observaron parámetros organolépticos, fisicoquímicos fuera de especificaciones durante la duración del ensayo. Las muestras se mantuvieron estables en las condiciones del ensayo.				

Resultado Final del Ensayo: El producto evaluado demuestra mantenerse estable en las diferentes condiciones a las cuales ha sido sometido, cumpliéndose por lo tanto los requerimientos.

ANEXO N° 14

Análisis estadístico del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* L. “achiote”, método DPPH

ANOVA

Absorbancia

	Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.450	5	.090	885228.669	.000
Dentro de grupos	.000	12	.000		
Total	.450	17			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: absorbancia

Tukey HSD

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencias de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 mg/mL	0.8 mg/mL	.1599000*	.0002603	.000	.159026	.160774
	1.6 mg/mL	.2031000*	.0002603	.000	.202226	.203974
	3.2 mg/mL	.2539000*	.0002603	.000	.253026	.254774
	6 mg/mL	.3000000*	.0002603	.000	.299126	.300874
	12 mg/mL	.5243000*	.0002603	.000	.523426	.525174
0.8 mg/mL	0 mg/mL	-.1599000*	.0002603	.000	-.160774	-.159026
	1.6 mg/mL	.0432000*	.0002603	.000	.042326	.044074
	3.2 mg/mL	.0940000*	.0002603	.000	.093126	.094874
	6 mg/mL	.1401000*	.0002603	.000	.139226	.140974
	12 mg/mL	.3644000*	.0002603	.000	.363526	.365274
1.6 mg/mL	0 mg/mL	-.2031000*	.0002603	.000	-.203974	-.202226
	0.8 mg/mL	-.0432000*	.0002603	.000	-.044074	-.042326

	3.2 mg/mL	.0508000*	.0002603	.000	.049926	.051674
	6 mg/mL	.0969000*	.0002603	.000	.096026	.097774
	12 mg/mL	.3212000*	.0002603	.000	.320326	.322074
3.2 mg/mL	0 mg/mL	-.2539000*	.0002603	.000	-.254774	-.253026
	0.8 mg/mL	-.0940000*	.0002603	.000	-.094874	-.093126
	1.6 mg/mL	-.0508000*	.0002603	.000	-.051674	-.049926
	6 mg/mL	.0461000*	.0002603	.000	.045226	.046974
	12 mg/mL	.2704000*	.0002603	.000	.269526	.271274
6 mg/mL	0 mg/mL	-.3000000*	.0002603	.000	-.300874	-.299126
	0.8 mg/mL	-.1401000*	.0002603	.000	-.140974	-.139226
	1.6 mg/mL	-.0969000*	.0002603	.000	-.097774	-.096026
	3.2 mg/mL	-.0461000*	.0002603	.000	-.046974	-.045226
	12 mg/mL	.2243000*	.0002603	.000	.223426	.225174
12 mg/mL	0 mg/mL	-.5243000*	.0002603	.000	-.525174	-.523426
	0.8 mg/mL	-.3644000*	.0002603	.000	-.365274	-.363526
	1.6 mg/mL	-.3212000*	.0002603	.000	-.322074	-.320326
	3.2 mg/mL	-.2704000*	.0002603	.000	-.271274	-.269526
	6 mg/mL	-.2243000*	.0002603	.000	-.225174	-.223426

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO N° 15
Análisis estadístico del Trolox ®, método DPPH

ANOVA

absorbancia

	Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.159	4	.040	343588.629	.000
Dentro de grupos	.000	10	.000		
Total	.159	14			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: absorbancia

Tukey HSD

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencias de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/mL	1.6 ug/mL	.1599000*	.0002781	.000	.158985	.160815
	3.2 ug/mL	.2031000*	.0002781	.000	.202185	.204015
	6.4 ug/mL	.2539000*	.0002781	.000	.252985	.254815
	8 ug/mL	.3000000*	.0002781	.000	.299085	.300915
1.6 ug/mL	0 ug/mL	-.1599000*	.0002781	.000	-.160815	-.158985
	3.2 ug/mL	.0432000*	.0002781	.000	.042285	.044115
	6.4 ug/mL	.0940000*	.0002781	.000	.093085	.094915
	8 ug/mL	.1401000*	.0002781	.000	.139185	.141015
3.2 ug/mL	0 ug/mL	-.2031000*	.0002781	.000	-.204015	-.202185
	1.6 ug/mL	-.0432000*	.0002781	.000	-.044115	-.042285
	6.4 ug/mL	.0508000*	.0002781	.000	.049885	.051715
	8 ug/mL	.0969000*	.0002781	.000	.095985	.097815
6.4 ug/mL	0 ug/mL	-.2539000*	.0002781	.000	-.254815	-.252985
	1.6 ug/mL	-.0940000*	.0002781	.000	-.094915	-.093085
	3.2 ug/mL	-.0508000*	.0002781	.000	-.051715	-.049885
	8 ug/mL	.0461000*	.0002781	.000	.045185	.047015
8 ug/mL	0 ug/mL	-.3000000*	.0002781	.000	-.300915	-.299085
	1.6 ug/mL	-.1401000*	.0002781	.000	-.141015	-.139185
	3.2 ug/mL	-.0969000*	.0002781	.000	-.097815	-.095985
	6.4 ug/mL	-.0461000*	.0002781	.000	-.047015	-.045185

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.